(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-504393
(P2012-504393A)
(43)公表日　平成24年2月23日(2012.2.23)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00		4B063
A61K 35/14	(2006.01)	A61K	35/14		4B064
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H	4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 91 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-529472 (P2011-529472)
(86)(22)出願日　平成21年9月28日 (2009.9.28)
(85)翻訳文提出日　平成23年3月28日 (2011.3.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2009/006980
(87)国際公開番号　WO2010/037514
(87)国際公開日　平成22年4月8日 (2010.4.8)
(31)優先権主張番号　08017305.7
(32)優先日　平成20年10月1日 (2008.10.1)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　08017921.1
(32)優先日　平成20年10月13日 (2008.10.13)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　61/105,928
(32)優先日　平成20年10月16日 (2008.10.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　506258073
イマティクス　バイオテクノロジーズ　ゲーエムベーハー
ドイツ，７２０７６　テュービンゲン，パウル－エンリヒ－シュトラーセ　１５
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(74)代理人　100135208
弁理士　大杉　卓也
(74)代理人　100152319
弁理士　曽我　亜紀

最終頁に続く

(54)【発明の名称】神経細胞性脳腫瘍など数種の腫瘍に対する新規免疫療法

(57)【要約】
本発明は、免疫療法で用いられるペプチド、核酸および細胞に関する。特に、本発明は、癌の免疫療法に関する。本発明はさらに、腫瘍関連の細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）のペプチドエピトープ単独について、または抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の医薬有効成分として働く他の腫瘍関連ペプチドとこれらエピトープとの組み合わせに関する。本発明は、抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチン組成物で使用され得る、ヒト腫瘍細胞のHLAクラス Ｉ およびクラス II 分子に由来する３０個のペプチド配列と変異体に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号:１～３０からなる群から選択される配列を含むペプチドまたはその変異体であって、該変異体は、配列番号:１～３０と少なくとも８５％の相同性を示す配列であるか、または該変異体は、完全長のポリペプチドではなく、該変異体ペプチドでＴ細胞交差反応を誘導するものである、ペプチド。
【請求項２】
ペプチドまたはその変異体が、ヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIまたはクラスII分子に結合する能力を維持しており、さらに前記ペプチドはCD4またはCD8T細胞を刺激できる、請求項１に記載のペプチド。
【請求項３】
アミノ酸配列が配列番号:１～３０の群に記載のアミノ酸の連続ストレッチ（ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ　ｓｔｒｅｔｃｈ）を含む、請求項１または２に記載のペプチド。
【請求項４】
ペプチドは表２に記載の特異的なＨＬＡサブタイプを有するペプチドから選択され、CD8細胞を刺激する能力があり、および前記ペプチドは表２に記載の特異的なアンカーアミノ酸モチーフを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項５】
ペプチドまたはその変異体の全長が、8～100残基、好ましくは8～30残基、より好ましくは8～16残基、最も好ましくはペプチドが配列番号:１～３０に記載のアミノ酸配列からなる、またはそれらから本質的になる、請求項１～４のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項６】
ペプチドが修飾されているかおよび／または非ペプチド結合を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項７】
ペプチドが、融合タンパク質であり、特に、HLA-DR 抗原関連変異体鎖（Ii）のN-末端アミノ酸を有する、請求項１～６のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載のペプチドをコードする核酸。
【請求項９】
請求項８に記載の核酸を発現する能力のある発現ベクター。
【請求項１０】
薬剤に使用するための、請求項１～７のいずれか１項に記載のペプチド、請求項８に記載の核酸または請求項９に記載の発現ベクター。
【請求項１１】
宿主細胞が、好ましくは抗原提示細胞であり、特に樹状細胞または抗原提示細胞である、請求項８に記載の核酸または請求項９に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。
【請求項１２】
請求項８に記載の核酸または請求項９に記載の発現ベクターを発現させる請求項１１に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培地からペプチドを単離することを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載のペプチドを生成する方法。
【請求項１３】
抗原特異的方法で細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を活性化するのに十分な期間、in vitroでＣＴＬを、適当な抗原提示細胞表面上で発現された抗原負荷ヒトクラスIまたはクラスIIのMHC分子と接触させるか、または抗原提示細胞を模倣する人工構築物と接触させることを含み、前記抗原が請求項１～１０のいずれか１項に記載のペプチドである、in vitroで活性化ＣＴＬを生成する方法。
【請求項１４】
請求項１３に記載の方法により生成され、請求項１～５のいずれか１項で与えられたアミノ酸配列を含むポリペプチドを異常に発現する細胞を選択的に認識する、活性化ＣＴＬ

。
【請求項１５】
請求項１～８のいずれか１項で与えられたアミノ酸配列を含むポリペプチドを異常に発現する標的細胞を有する患者の標的細胞を死滅させる方法であって、請求項１４で定義されたようなＣＴＬを効果的な数で患者に投与することを含む、方法。
【請求項１６】
好ましくは抗癌剤がワクチンである、癌の治療のためのまたは抗癌剤の製造における、請求項１～７のいずれか１つに記載のペプチド、請求項８に記載の核酸、請求項９に記載の発現ベクター、請求項１１に記載の細胞、または請求項１４記載の活性化ＣＴＬ、の使用。
【請求項１７】
癌が、星細胞腫、毛様細胞性星細胞腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、乏突起膠腫、上衣腫、多形神経膠芽腫、混合膠腫、神経膠腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、胚細胞種、奇形腫、神経節膠腫、神経節細胞腫、中枢神経節細胞腫、原始神経外胚葉性腫瘍（PNETすなわち、髄芽腫、髄上皮腫、神経芽種、網膜芽細胞腫、上衣芽腫など）、松果体組織にでききた腫瘍（松果体細胞腫や松果体芽腫など）、上衣細胞腫、脈絡叢腫瘍、原発不明の神経皮腫瘍（大脳神経膠腫症、星状芽細胞腫など）、神経膠芽腫、前立腺腫瘍、乳癌、食道癌、結腸直腸癌、腎明細胞癌、肺癌、中枢神経系腫瘍、卵巣癌、メラノーマ、膵臓癌、扁平上皮癌、白血病および髄芽腫、および、大腸、結腸、胃、腎臓、胚、膵臓、前立腺、皮膚またはサービビンおよび／またはCSPG4、および／または配列番号:１～３０のペプチド由来の他のタンパク質の過剰発現を示す他の腫瘍から選択される、請求項１６に記載の使用。
【請求項１８】
（ａ）請求項１～７のいずれか１つのペプチド、請求項８に記載の核酸、請求項９に記載の発現ベクター、請求項１１に記載の細胞、または請求項１４に記載の活性化ＣＴＬを含有する医薬組成物を溶液または凍結乾燥状態で含む容器；
（ｂ）任意で、凍結乾燥調製物用の希釈剤あるいは再構成溶液を含む第２容器；
（ｃ）任意で、配列番号:１～３０に記載のペプチドからなる群から選択される１つ以上のペプチド、および
（ｄ）任意で、（ｉ）溶液の使用、または（ｉｉ）凍結乾燥調製物の構成および／または使用のための指示書、を含むキット。
【請求項１９】
（ｉｉｉ）緩衝剤、（ｉｖ）希釈剤、（ｖ）フィルタ、（ｖｉ）針、または（ｖｉｉ）注射器の１つもしくは複数をさらに含む、請求項１８に記載のキット。
【請求項２０】
前記ペプチドが配列番号:１および配列番号２０からなる群から選択される、請求項１８または１９に記載のキット。
【請求項２１】
脳から得られる試料または診断される被験者由来の別の腫瘍試料において、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび／またはPDPNの発現を解析することを含む、神経膠芽細胞腫を他種の癌と区別するための方法。
【請求項２２】
選択した神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの抗体、またはBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび／またはPDPNのmRNAと特異的にハイブリダイズする１つ以上の核酸、および任意で、コントロール（例えば、特定量の特定神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチド）、適切な場合に一次および二次抗体、および任意で、検出可能な部位、酵素基質および／または発色試薬を含む、神経膠芽細胞腫マーカー遺伝子としてのBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび／またはPDPNの発現レベルを測定するキット。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫療法で用いられるペプチド、核酸および細胞に関する。特に、本発明は、癌の免疫療法に関する。本発明はさらに、腫瘍関連障害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）のペプチドエピトープ単独について、あるいは抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の薬剤有効成分として働く他の腫瘍関連ペプチドとこれらエピトープとの組み合わせに関する。本発明は、抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチン組成物で使用され得る、ヒト腫瘍細胞のHLAクラスIおよびクラスII分子に由来する30個のペプチド配列と変異体に関する。
【背景技術】
【０００２】
神経膠腫は神経系の膠細胞由来の脳腫瘍である。膠細胞は、一般に神経膠細胞、または単にグリアと呼ばれる非神経細胞であり、神経系において、神経細胞の維持と栄養補給、ホメオスタシスの維持、髄鞘（ミエリン）の構成を司り、神経伝達に関与している。神経膠腫の最も重要な2つのサブグループは、星状膠細胞腫と稀突起膠細胞腫であり、それらが由来する正常な膠細胞種である星状膠細胞、または稀突起膠細胞よりそれぞれ名前がつけられた。星状膠細胞腫のサブグループに属する多形性神経膠芽細胞腫（以下、神経膠芽細胞腫という）は、成人に最も多い悪性脳腫瘍であり、全悪性脳腫瘍の約40％、また、神経膠腫の約50％を占めている。神経膠芽細胞腫は中枢神経系（CNS）への浸潤が非常に強く、全神経膠腫中で最も高いグレード（grade IV）に入る。神経膠腫の治療方法は、神経画像処理や顕微手術の改良、また、テモゾロミドや放射線など多岐にわたる治療が選択できるようになったことで着実に進歩してきているが、神経膠芽細胞腫は未だに不治の病である。この脳腫瘍の致死率は非常に高く、最初に診断されてからの平均余命は9～12ヶ月である。1986年から1990年の観察期間中の5年生存率は8.0％であった。今日まで、腫瘍全摘出などの積極的治療法施行後の5年生存率は未だに10％未満である。そのため、これに代わりうる効果的な治療方法を求める医療ニーズは高い。
【０００３】
神経膠芽細胞腫の腫瘍細胞は、脳腫瘍の中で最も未分化であり、そのため遊走能および増殖能が高く、また浸潤性が高く、予後が極めて悪くなる。神経膠芽細胞腫は、脳内で急速に、侵攻的に、更に浸潤的に発育するため、死につながっている。神経膠芽細胞腫は浸潤性発育型のため、本来摘出不能である。また、神経膠芽細胞腫は、比較的、放射線や化学療法に耐性を持つため、治療後の再発率が高い。更に、これらの腫瘍細胞に対する免疫応答性には、摘出し放射線照射後、全腫瘍細胞を完全に根絶できるほどの効果はむしろない。
【０００４】
神経膠芽細胞腫は、分化星状膠細胞またはグリア前駆細胞の悪性転換過程での遺伝子メカニズムの違いによって、原発性神経膠芽細胞腫（de novo）と続発性神経膠芽細胞腫に分けられる。続発性神経膠芽細胞腫は、45歳までの若年層に発症する。続発性神経膠芽細胞腫は、平均して4年から5年の間に低グレードの星状細胞腫から未分化星状細胞腫に進展する。対照的に、原発性神経膠芽細胞腫は老年層に圧倒的に多く発症し、平均年齢は55歳である。一般的に、原発性神経膠芽細胞腫は劇症として発症し、臨床的、または病理的に異常のない状態から3ヶ月以内に腫瘍が進行するのが特徴である（Pathologyand Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000)）。
【０００５】
神経膠芽細胞腫は有髄神経に沿って移動し、中枢神経系内に広範囲に広がる。殆どの症例で、外科的治療でも治療効果の持続が限られている。悪性神経膠腫細胞は、T細胞の増殖と免疫を刺激するサイトカインIL-2産生を減弱させる免疫抑制物質を生成することにより、宿主の免疫系からの探知を逃れる。
【０００６】
頭蓋内腫瘍は、脳、髄膜、脳下垂体、頭蓋骨、更に胚組織の残りなど、CNSに存在するあらゆる構造や細胞型から発生しうる。米国における原発性脳腫瘍の年間総罹患件数は人

口10万人に対して14例である。

最も好発する原発性脳腫瘍は髄膜腫および神経膠芽細胞腫であり、髄膜腫は全原発性脳腫瘍の27％、神経膠芽細胞腫は23％を占める（ただし、成人の悪性脳腫瘍では、神経膠芽細胞腫が40％を占める）。これらの腫瘍の多くは進行性で、グレードが高い。原発性脳腫瘍は小児に最も好発する固形腫瘍であり、小児癌の中では白血病に次いで2番目に多い死因となっている。

【０００７】

神経膠芽細胞腫患者に対する効果的な治療方法の探究は今日もなお続けられている。これらの腫瘍細胞と戦うため、免疫療法すなわち免疫系の補充による治療法が研究されてきている。神経膠芽細胞腫に罹患した患者における免疫療法の最初の有望な結果は、「DCVaxBrain」いわゆる、自己腫瘍細胞を載せた患者由来の樹状細胞を使用する、細胞に基づくワクチン接種アプローチを使って、NorthwestBiotherapeutics社により得られた。さらにCelldex社では、そのアプローチで抗原特異性 ＣＴＬ応答を誘導するためにEGFRvIII 由来のペプチドを使用した結果、順に、生存期間中央値が標準療法による値よりも長いことに関連していた(Heimberger et al., 2006)。

【０００８】

大腸癌

米国癌協会（ACS）によると、大腸癌（CRC）は米国で3番目に多い癌であり、175,000例を超える患者が毎年新たに罹患している。米国、日本、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン、英国では480,000名を超える患者が罹患している。先進国での癌による死亡の最も一般的な原因の1つである。大腸癌患者の1年および5年相対生存率はそれぞれ84%と64%である。生存率は診断後5年から 10 年で 57% まで減少し続ける。大腸癌は早期の限局的病期で発見されれば、5年生存率は90%であるが、この病期で診断される大腸癌はわずか39%であり、ほとんどが低率スクリーニングのためである。癌が隣接臓器やリンパ節など局部的に広がると、5年生存率は 68% に落ちる。遠隔転移した患者の 5 年生存率は 10% である。

【０００９】

大腸癌の発症は遺伝的要因と環境的要因の相互作用の結果であることを調査が示唆している。殆どの場合、腺腫性ポリープが大腸癌の前駆状態として現れるが、癌への移行には多年を要することもある。大腸癌の主なリスク要因は年齢であり、大腸癌と診断される症例の90％が50歳を超えている。米国癌協会によると大腸癌の他のリスク要因には、アルコール消費量、脂肪および／または赤身肉の多い食事、および果物野菜の不十分な摂取などが含まれる。大腸癌発生の増加が続いているのは、特に、脂肪や肉の過剰摂取と、線維分摂取の低下につながる西欧諸国の食事を取り入れた日本などの地域によると思われる。しかしながら、スクリーニングの増加やポリープの除去が、ポリープの癌への進行を防いでいると考えられ、発症率の増加は以前ほど速くはない。

【００１０】

殆どの固形腫瘍でファーストライン治療は手術であるが、その利点は早期の患者に限られ、大半の患者は進行期で診断されている。進行大腸癌には、フルオロウラシル系の化学療法レジメンが標準治療となっている。これらのレジメンの大半は、FOLFOX（5-FU点滴／ロイコボリン＋オキサリプラチン）とFOLFIRI（イリノテカン、ロイコボリン、5-FUのボーラス投与と持続点滴）と呼ばれるプロトコールである。

【００１１】

イリノテカンやオキサリプラチンのような第3世代の細胞傷害性抗癌剤の導入により有意に有効性が向上するという期待が高まっているが、その予後はまだ比較的悪く、生存率は転移癌では約20ヶ月に留まっており、そのため、大腸癌の薬剤開発のニーズはなおも高くなっている。

【００１２】

最近、アバスチン（登録商標）（ベバシズマブ）やエルビタックス（登録商標）（セツキシマブ）のような、分子標的薬といわれる新世代の抗癌剤が利用できるようになり、大

腸癌の異なる病期を対象とし、現在約40種の化合物が臨床開発の最終試験に入っている。これらの化合物数種を併用すると、将来期待される治療選択肢の数が増える。多くの物質が第2相試験に入っており、これらの化合物が、大腸癌の治験でいずれの標的よりも頻繁に着目しているのがEGFRであり、それは、約80% の大腸癌患者で EGFR の発現がアップレギュレートされているためである。

【００１３】

病期ＩＩの患者を対象とした、最近承認されたモノクローナル抗体（mAbs）（セツキシマブ＋イリノテカンまたはFOLFOX4、ベバシズマブ(bevacizumab)単剤またはFOLFOX4との併用）化学療法の臨床試験が現在実施中である。これらの臨床試験で統計的に有意な結果を出すためには、3～4年の観察期間が求められる。

【００１４】

一般に腫瘍学で現在使われているモノクローナル抗体（mAbs）は、実施中の免疫療法を妨害しないという点で他を上回る可能性を有している。事実、VEGFの枯渇は、DC仲介のT細胞活性化促進に貢献していることを示唆する前臨床結果と臨床成績がある（Osada T, Chong G,Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, Nixon AB, Lyerly HK,Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGFtherapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients.CancerImmunol Immunother.2008 Jan 10.）

【００１５】

前立腺癌およびその他の腫瘍

前立腺癌による死亡は2007年に27,050例と推定され、男性の癌において主要な死因となっている。白人とアフリカ系米国人男性では1990年初頭より、その死亡率は減少しているが、アフリカ系米国人男性の死亡率はなおも白人男性の2倍を超えている。前立腺癌は男性で最も頻繁に診断される癌である。理由は未だ不明であるが、アフリカ系米国人男性の発症率は白人男性よりも有意に高い。前立腺癌の発症率はここ20年でかなり変化している。つまり、1988～1992年では急増し、1992～1995年では急減し、1995年以降は徐々に増えている。この傾向は、前立腺特異抗原（PSA）血液検査による前立腺癌スクリーニングの増加によるところが大きい。過去10年間で発症率が徐々に上昇していることの大部分は、65歳未満の男性の間でPSAスクリーニングが広まったことに帰する可能性が最も高い。男性前立腺癌の発症率は65歳以上では横ばいとなる。白人男性での発症率のピークは1992年（10万人中237.6例）に、アフリカ系米国人男性では1993年（10万人中342.8例）にある。

【００１６】

前立腺癌の治療として、待機療法、手術、放射線療法、高密度焦点式超音波療法（HIFU）、化学療法、凍結手術、内分泌療法、またはそれらの併用療法が考えられる。どの治療法が最適かは、病期、Gleasonスコア、PSAレベルによって決まる。他の重要な要因は、男性の年齢、全体的な健康状態、可能な治療法に対する患者の感情、および副作用の可能性などである。治療法は全て、勃起不全や尿失禁など重大な副作用をもたらす可能性があるため、治療法を検討する際は、しばしば、治療目標と生活習慣の変化によるリスクとのバランスに焦点が当てられる。

【００１７】

癌が前立腺以外に転移すると、治療選択肢はかなり変化するため、前立腺癌を治療する殆どの医師は、様々なノモグラフを利用して転移の可能性を予測する。待機療法、HIFU、放射線療法、凍結手術、手術などによる治療法は、一般的に癌が前立腺内に留まっている男性に実施される。内分泌療法と化学療法は、たびたび前立腺以外に転移した場合のためにとっておかれる。しかし、一部の進行性腫瘍に放射線療法を、一部の早期腫瘍に内分泌療法を使用するという例外もある。初期療法が成功せず、癌が進行する場合、凍結療法、内分泌療法、および化学療法が適用されることもある。

【００１８】

癌が臓器内の発育に限定されることが臨床的に推測されたため、前立腺全摘術を施行した前立腺癌患者のかなりの人数に、手術準備用の最も確実な組織化学的検査で、臓器の境界を越えて局部的に転移した腫瘍がみられる。これらの患者は早期に局部再発するリスク

が高く、通常、生化学的再発という点でPSAレベルの上昇として検出されうる。この状況での治療選択肢は、外部放射線療法とホルモン除去療法があるが、これらの治療アプローチの価値は、特に患者の長期生存率を延長するという点において、証明されたとみなすわけにはいかない。更に、尿道狭窄の発生（放射線療法）、性欲の喪失やインポテンス、骨粗鬆症に関与する骨カルシウム塩の減少リスク、病理的骨折リスクの顕著な増加（ホルモン除去療法）など、治療に関連する合併症の可能性を考慮しなければならない。

【００１９】

前立腺癌患者全員の90％以上が局部的な段階および限局期で発見される。腫瘍と診断された患者の5年相対生存率は、これらの病期では100％に近い。過去25年間で、全病期を合わせた5年生存率は69％から90％近くに上昇した。つい最近のデータによれば、10年相対生存率は93％であり、15年生存率は77％である。生存率の劇的な改善、特に5年生存率の改善は、一部早期診断と治療法の改善に帰する。しかしながら、他の組織や臓器に転移後の生存率は大幅に低下する。

【００２０】

肺癌

2007年、米国では、癌診断症例の約15％にあたる、推定210,000例が新たに肺癌になることが予想されている。男性の発症率は、1984年の10,000人当たり102例から2003年の78.5例に有意に減少している。女性では、発症率は長期間にわたり上昇が続いた後、ほぼ横ばい状態となっている。肺癌は治療目的から、臨床的に小細胞癌（13％）または非小細胞癌（87％）に分類される。

【００２１】

肺癌は男女とも癌において最も多い死因となっている。2007年には、推定死亡例は160,390例となることが予想され、これは癌の全死亡例の約29％を占める。1987年以降、毎年乳癌よりも肺癌により死亡する女性が多くなっている。男性の死亡率は1991年から2003年の間、毎年約1.9％ずつ有意に低下し続けた。女性の肺癌死亡率は数十年間連続して上昇した後、ほぼ横ばい状態となっている。肺癌死亡率のこれらの傾向は、過去30年間の喫煙率の低下を反映している。

【００２２】

治療選択肢は癌のタイプ（小細胞癌か非小細胞癌か）と病期によって決定され、手術、放射線療法、化学療法、ベバシズマブ（アバスチン（登録商標））およびエルロチニブ(erlotinib)（タルセバ（登録商標））などの分子標的療法がある。限局性の癌には通常手術が選択される。最近の試験では、早期非小細胞肺癌の生存率は術後の化学療法により改善されることが示されている。肺癌は発見時には通常転移しているため、放射線療法と化学療法が頻繁に使われ、手術と併用されることもある。化学療法のみまたは放射線との併用が小細胞肺癌に通常選択される治療法である。この治療法では、高い割合の患者が、症例によっては長く続く寛解を経験している。

【００２３】

肺癌の1年相対生存率は、1975～1979年の37％から2002年には42％にわずかながら増加したが、これは大部分が手術テクニックと併用療法の改善によるものである。しかし、5年生存率は全ての病期を合わせてもわずか16％である。癌がまだ限局しているうちに発見されると生存率は49％であるが、早期に診断される肺癌は16％にすぎない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００２４】

【非特許文献１】Pathologyand Genetics of the Nervous Systems. 29-39 (IARC Press, Lyon, France, 2000)

【非特許文献２】Osada T, Chong G,Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, Hurwitz HI, Dev I, NixonAB, Lyerly HK, Clay T, Morse MA. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendriticcells in cancer patients.Cancer Immunol Immunother.2008 Jan 10.

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２５】
それ故、神経膠芽細胞腫、前立腺腫瘍、乳癌、食道癌、大腸癌、腎明細胞癌、肺癌、CNS、卵巣癌、メラノーマ、膵臓癌、扁平上皮癌、白血病、髄芽腫、およびサービビンの過剰発現を示す他の腫瘍に対し、重度の副作用に至る可能性がある化学療法剤や他の薬剤を使用せずに患者の幸福を促進させる、有効で安全な新規療法の選択肢の必要性は未だにある。
【課題を解決するための手段】
【００２６】
その第１の態様において、本発明は、配列番号:１～３０の群か、配列番号:１～３０までと少なくとも85%相同性であるその変異体か、Ｔ細胞の前記変異体ペプチドとの交差反応を誘導するその変異体から選択された配列を含むペプチドであって、ヒトサービビンの完全な長さのポリペプチドではない前記ペプチドに関する。好ましくは、前記ペプチドは表２に従い、HLA-A*02または HLA-DRのような特異的なHLAサブタイプを有するペプチドから選択される。
【００２７】
第2の態様において、本発明は、核酸、本発明に記載のペプチドのコード化、あるいは前記核酸を発現する能力のある発現ベクターに関する。
【００２８】
第3の態様において、本発明は、本発明に従って核酸または発現ベクターを含む宿主細胞に関連し、ここで前記宿主細胞は好ましくは抗原提示細胞であり、特に樹状細胞すなわち抗原提示細胞である。
【００２９】
本発明の第4の態様は、invitroでの活性化された細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を生成する方法であって、in vitroでＣＴＬを、抗原特異的方法で前記ＣＴＬを活性化するのに十分な期間、適当な抗原提示細胞表面上で発現された抗原負荷ヒトクラスＩまたはＩＩＭＨＣ分子と接触させるか、または抗原提示細胞を模倣する人工構築物と接触させることを含むことに関連し、ここで前記抗原は本発明に記載のペプチドである。
【００３０】
本発明の第5の態様では、本発明は、本発明に記載のペプチド、本発明に記載の核酸または発現ベクター、本発明に記載の細胞、あるいは癌治療または抗癌剤の製造に関する本発明に従って生成された活性化細胞傷害性Ｔリンパ球の使用に関連しており、前記抗癌剤は好ましくはワクチンである。好ましくは、前記癌は、星細胞腫、毛様細胞性星細胞腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、乏突起膠腫、上衣腫、多形神経膠芽腫、混合膠腫、神経膠腫、髄芽腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、胚細胞種、奇形腫、神経節膠腫、神経節細胞腫、中枢神経節細胞腫、原始神経外胚葉性腫瘍（PNETすなわち、髄芽腫，髄上皮腫，神経芽種，網膜芽細胞腫，上衣芽腫など）、松果体組織にできた腫瘍（松果体細胞腫や松果体芽腫など）、上衣細胞腫、脈絡叢腫瘍、原発不明の神経皮腫瘍（大脳神経膠腫症、星状芽細胞腫など）、神経膠芽腫、前立腺腫瘍、乳癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、肺癌、中枢神経系腫瘍、卵巣癌、メラノーマ、膵臓癌、扁平上皮癌、白血病および髄芽腫、およびサービビンおよび／または本発明の他のタンパク質の過剰発現を示す他の腫瘍または癌から選択される。
【００３１】
第6の態様では、本発明は以下を有するキットに関する。（ａ）本発明に記載のペプチド、本発明に記載の発現ベクター、本発明に記載の細胞、または本発明に従って生成された活性化細胞傷害性Ｔリンパ球を含む医薬組成物を溶液または凍結乾燥物として含んでいる容器、（ｂ）任意で、凍結乾燥製剤用の希釈剤もしくは再構成溶液を含む第二の容器、（ｃ）任意で、配列番号：１～３０に記載のペプチトからなる群から選択される少なくとも1つのペプチド、（ｄ）任意で、溶液および／または再構成溶液の使用、および／また

は凍結乾燥製剤についての指示書。好ましい実施形態では、ペプチドは配列番号:１～２４の群から選択される。

【００３２】

さらに、本発明の第7の態様では、本発明は、HLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIあるいはIIに特異的に結合している組み換え抗体の生成方法に関する。その方法には、HLA制限抗原と複合体を形成している前記ヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIあるいはIIの溶解型前記MHCを発現する細胞を含む遺伝子組換え非ヒトほ乳類の免疫化方法、前記非ヒトほ乳類の細胞を生成する抗体からのmRNA分子の単離方法、前記mRNA分子によりコードされたタンパク質分子を表示するファージディスプレイライブラリーの生成方法、および前記ファージディスプレイライブラリーの１つ以上のファージ、つまりHLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスＩあるいはIIに特異的に結合している前記抗体を表示する１つ以上の前記ファージの単離方法が含まれる。

【００３３】

第8の態様では、HLA-制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIあるいはIIに特異的に結合する抗体では、その抗体は好ましくはポリクロナール抗体、モノクローナル抗体および／またはキメラ抗体である。

【図面の簡単な説明】

【００３４】

【図１】図1は、MHCクラスIに制限された方法で与えられた神経膠芽細胞腫から腫瘍関連ペプチド（TUMAP）IGF2BP3-001を同定する、 ESI-液体クロマトグラフィー質量スペクトルを示す。

【図２ａ】図2は、神経膠芽細胞腫試料中で高く過剰発現されている本発明の標的遺伝子のmRNA発現プロフィールを表している。これら遺伝子の発現は、正常組織では存在しないか非常に低いが、神経膠芽細胞腫試料では強く増大する。相対的なmRNA発現は、遺伝子チップ解析によって測定された数種の正常細胞と個別の多形性神経膠芽細胞腫（GBM）試料で見られている。値は正常な腎臓の発現レベルに関連している（値は常に適宜1.0に設定される）。正常組織の値は、市販のmRNAプールにより生成された。ブラケットの文字は、解析ソフトウェアによって与えられるように「検出コール」を示す。「検出コール」は転写物が特異的に検出されたかどうか、または有意な検出が観察される可能性があるかどうかを示している。検出コールは、"P"(present:検出あり),"A"（absence:検出なし)、または"M" (marginally detected:僅かに検出)の値を取ることができます。

【図２ｂ】図2は、神経膠芽細胞腫試料中で高く過剰発現されている本発明の標的遺伝子のmRNA発現プロフィールを表している。これら遺伝子の発現は、正常組織では存在しないか非常に低いが、神経膠芽細胞腫試料では強く増大する。相対的なmRNA発現は、遺伝子チップ解析によって測定された数種の正常細胞と個別の多形性神経膠芽細胞腫（GBM）試料で見られている。値は正常な腎臓の発現レベルに関連している（値は常に適宜1.0に設定される）。正常組織の値は、市販のmRNAプールにより生成された。ブラケットの文字は、解析ソフトウェアによって与えられるように「検出コール」を示す。「検出コール」は転写物が特異的に検出されたかどうか、または有意な検出が観察される可能性があるかどうかを示している。検出コールは、"P"(present:検出あり), "A"（absence:検出なし)、または"M" (marginallydetected:僅かに検出)の値を取ることができます。

【図３】図3は、健常ドナーの末梢血から採取した、CSP-001およびNLGN4X-001特異的CD8+リンパ球のミクロスフェアによる増殖のテトラマー分析を示す。抗CD28抗体＋高密度腫瘍抗原A*0201/CSP-001（左図）または抗CD28抗体＋高密度腫瘍抗原A*0201/NLGN4X-001（右図）を結合したミクロスフェアを用い、1ウェルあたり1×10^6個のCD8+強化PBMCを1週間ごとに刺激した。in vitroで3回刺激後、全ての細胞を抗体CD8FITC、および蛍光標識した四量体A*0201/ CSP-001およびA*0201/ NLGN4X-001により染色した。 細胞はCD8+リンパ球のゲートを通過させ、数値はCD8+リンパ球について、図の四分区に入った細胞の割合を示す。

【図４】図4は、HLA-A*0201対立遺伝子でコードされるMHC分子に対する、本発明のHLAクラスIペプチドの親和性を示す。本発明のHLAクラスITUMAPとコントロールペプチドHBV-001（強いA*02の結合因子）の解離定数（K_D）は、ELISAに基づくMHCアッセイにより測定された。

【発明を実施するための形態】

【００３５】

本発明で使用される全ての用語は、特に記載されない限り、以下に定義する通りである。

【００３６】

「ペプチド」という用語は、本明細書では、隣接したアミノ酸のαアミノ基とカルボニル基間のペプチド結合によって、通常互いに結合された一連のアミノ酸残基を表すために使用される。前記ペプチドは、通常9アミノ酸長であるが、最短で8アミノ酸長、最長で16、または10、11、12、13、14、15アミノ酸長である。

【００３７】

「オリゴペプチド」という用語は、本明細書では、隣接したアミノ酸のαアミノ基とカルボニル基間のペプチド結合によって、通常互いに結合された一連のアミノ酸残基を表すために使用される。正しいエピトープの1つあるいは複数がそこに保持される限り、オリゴペプチドの長さは本発明に決定的なものではない。オリゴペプチドの長さは通常、約30アミノ酸残基長未満で、約14アミノ酸長を超える

【００３８】

「ポリペプチド」という用語は、隣接したアミノ酸のαアミノ基とカルボニル基間のペプチド結合によって、通常互いに結合された一連のアミノ酸残基を表す。正しいエピトープの1つあるいは複数がそこに維持される限り、ポリペプチドの長さは本発明に決定的なものではない。ペプチドやオリゴペプチドという用語とは対照的に、ポリペプチドという用語は、約30アミノ酸残基を超える分子を示す。

【００３９】

そのような分子をコードするペプチド、オリゴペプチド、タンパク質は、免疫応答を誘導できる場合、「免疫原性」(したがって本発明内の「免疫原」)である。本発明の場合は、免疫原性はT細胞応答を誘導する能力としてより明確に定義される。従って、「免疫原」は、免疫応答の誘導が可能な分子で、本発明の場合は、T細胞応答を誘導できる分子と考えられる。

【００４０】

T細胞の「エピトープ」は、クラスIあるいはIIMHC受容体に結合し、三元複合体（MHCクラスIα鎖、β－2－ミクログロブリン、およびペプチド）を形成する短鎖ペプチドを必要とし、この三元複合体は、適度な親和性でMHC／ペプチド複合体と結合する対応T細胞受容体を有するT細胞によって認識されうる。MHCクラスI分子と結合するペプチドは通常、8～14アミノ酸長で、最も典型的には9アミノ酸長である。クラスIIMHC分子と結合するT細胞エピトープは通常、12～30アミノ酸長である。MHCクラスII分子と結合するペプチドの場合には、同じペプチドと対応するT細胞エピトープが共通のコア断片を共有することがあるが、コア配列のアミノ酸末端の上流とそのカルボキシ末端の下流で隣接配列の長さが異なるため、全体の長さが異なることがある。MHCクラスII受容体はより開いた立体構造になり、それに応じて、MHCクラスII受容体に結合しているペプチドは、MHCクラスI分子のペプチド結合溝に入るように、MHCクラスII分子のペプチド結合溝の構造に完全には入らなくなる。ペプチド長の変化がわずかでも活性は非常に低下するため（以下参照）、意外にも、これは配列番号:１のペプチドには当てはまらない。

【００４１】

ヒトでは、MHCクラスＩ分子をコードする3つの異なる遺伝子座（ヒトMHC分子はまたヒト白血球抗原（HLA）との呼ばれる）、HLA-A、HLA-B、とHLA-Cがある。

HLA-A*01、HLA-A*02およびHLA-A*11は、これら遺伝子座から発現されうる異なるMHCクラスＩ対立遺伝子の例である。

【００４２】
MHCクラスII遺伝子のヒトゲノムには、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPの3種類の遺伝子座がある。MHCクラスII受容体は、α鎖とβ鎖からなるヘテロダイマーであり、両鎖とも膜貫通領域により細胞膜に固定される。HLA-DRB1*04とHLA-ERB1*07は、これらの遺伝子座でコードされることが既知である、異なるMHCクラスIIβ対立遺伝子の2つの例である。クラスII対立遺伝子は非常に多様な形を持ち、例えば、数百種類のHLA-DRB1対立遺伝子が報告されている。それ故、治療と診断の目的には、数種類のHLAクラスII受容体に適度な親和性で結合するペプチドが大変望ましい。数種類のHLAクラスII分子に結合するペプチドは無差別な結合因子と呼ばれている。
【００４３】
本願で用いる通り、DNA配列に言及した場合、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAの両方が含まれる。そのため、特に記載のない限り、特異的配列とは、かかる配列の一本鎖DNA、かかる配列の相補鎖との二本鎖（二本鎖DNA）、およびかかる配列の相補鎖を示す。「コード領域」という用語は、天然ゲノム環境、すなわち、in vivoにおける遺伝子の天然発現産物のコード領域において、自然にまたは正常状態で該遺伝子の発現産物をコードする、遺伝子のその部分を示す。
【００４４】
コード領域は、正常の、変異した、または変化した遺伝子からなる可能性があり、また、DNA合成の当業者に周知の方法で研究室において完全に合成されたDNA配列または遺伝子のものである可能性もある。
【００４５】
「ヌクレオチド配列」という用語は、デオキシリボヌクレオチドのヘテロ多量体を示す。
【００４６】
特定のペプチド、オリゴペプチドまたはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、自然に発生することも、合成されることもある。一般に、本発明のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質をコードするDNAセグメントは、cDNAフラグメントおよび短いオリゴヌクレオチドリンカー、または一連のオリゴヌクレオチドから作製され、微生物またはウイルスオペロン由来の調節エレメントからなる遺伝子組換え転写単位内で発現されうる合成遺伝子を与える。
【００４７】
「発現産物」という用語は、遺伝子コード縮重の結果、同等遺伝子をコードするため、同一アミノ酸をコードしている、遺伝子およびあらゆる核酸配列から自然翻訳された、ポリペプチドまたはタンパク質を意味する。
【００４８】
「フラグメント」という用語は、コード配列に関する場合は、完全なコード領域より短いDNAの一部を意味し、その発現産物は、完全なコード領域の発現産物と本質的に同一の生物学的機能または活性を保持する。
【００４９】
「DNAセグメント」という用語は、分離フラグメントあるいはより大きいDNA構成物の一組成の形であるDNAポリマーを示し、このポリマーは十分に純粋な形、すなわち、内因性物質の混在がない形で、しかも、標準的な生化学的方法たとえばクローニングベクターによりセグメントやその構成ヌクレオチド配列の同定、操作、回収が可能な量と濃度で、少なくとも1回単離されたDNAから誘導されている。そのようなセグメントは、真核生物の遺伝子中で通常提示される内部非翻訳配列、すなわちイントロンによって中断されないオープンリーンディングフレームの形で与えられる。非翻訳DNA配列は、オープンリーンディングフレームの下流に存在することがあるが、コード領域の調節や発現を邪魔することはない。
【００５０】
「プライマー」という用語は一本鎖DNAと対になることができ、DNAポリメラーゼがデオ

キシリボ核酸鎖の合成を開始する遊離3'OH末端となる短い核酸配列を意味する。

【００５１】

「プロモーター」という用語は、転写を開始するRNAポリメラーゼの結合に関わるDNAの一領域を意味する。

【００５２】

「オープンリーディングフレーム（ORF）」という用語は、終止コドンが全くない、一連のアミノ酸トリプレットコードのことであり、タンパク質に翻訳される（可能性のある）配列である。

【００５３】

「単離される」という用語は、物質がその本来の環境（例えば、それが自然に発生するのであれば、自然環境）から取り除かれることを意味する。例えば、生存する動物の自然発生したポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されているとは言えないが、自然界の一部または全ての共存物質から分けられた同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていると言える。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部である可能性があり、および／またはそのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは組成物の一部となる可能性があり、そのようなベクターまたは組成物がその自然環境の一部ではないため、単離されていると言える。

【００５４】

本発明によって公表されているポリヌクレオチドおよび、遺伝子組換えポリペプチドまたは免疫原性ポリペプチドも、「精製されている」状態である。「精製される」という用語は、完全に精製される必要はなく、むしろ、相対的な定義を意味し、高純度に精製された調製物または、部分的にのみ精製された調製物も含むが、これらの用語は関連分野の当業者には理解されている。例えば、cDNAライブラリーから単離された個々のクローンは、電気泳動で均一になるように従来法で精製されている。出発物質または天然物質の精製では、最低でも有効数字1桁、好ましくは2桁または3桁、より好ましくは4桁または5桁で明確に意図される。更に、請求項におけるポリペプチドの純度は、重量で、好ましくは99.999％、または少なくとも99.99％または99.9％、更に望ましくは99％以上で明確に意図される。

【００５５】

本願によって開示される核酸およびポリペプチド発現産物、およびそのような核酸および／またはポリペプチドを含む発現ベクターは「濃縮型」である。本明細書で使用される通り、「濃縮型」と言う用語は、物質の濃度が（例えば）、それ自身の自然に存在する濃度の少なくとも約2、5、10、100、または1000倍であり、また、重量で0.01％であれば有利であり、好ましくは少なくとも約0.1％であることを意味する。また、濃縮型調製物で期待されるのは、重量で約0.5％、1％、5％、10％、および20％である。本発明における配列、構成物、ベクター、クローンおよび他の物質は、濃縮型または単離型であることが有利である。

【００５６】

「活性フラグメント」という用語は、選択的に適切なアジュバントと共に、または単独で、動物例えばウサギまたはマウス、およびヒトも含む哺乳動物に投与した際、免疫応答を起こす（すなわち免疫原性活性を有する）フラグメントを意味し、このような免疫応答は、ヒトなどの受容動物内でT細胞応答を刺激する。また、この「活性フラグメント」は、invitroでT細胞応答の誘導に使用されることもある。

【００５７】

本明細書では、「一部分」、「セグメント」、「フラグメント」という用語は、ポリペプチドに関して使用される時、アミノ酸残基のような残基の連続的な配列を指し、その配列はより大きな配列のサブセットを形成する。例えば、ポリペプチドがトリプシンまたはキモトリプシンのような一般的なエンドペプチダーゼの処理を受けた場合、そのような処理により得られるオリゴペプチドは、出発ポリペプチドの一部分、セグメントあるいはフラグメントに相当すると思われる。これは、そのようなフラグメントが必然的にアミノ酸

配列の一部としてセグメント、フラグメント、あるいは一部分を含んでおり、それらが、配列番号:１～３０の配列を持つ自然発生タンパク質、あるいは「親」タンパク質に相当する、配列番号:１～３０の配列に、全く同一ではないにせよ実質的に同一であることを意味する。ポリヌクレオチドに関連して使用する時、そのような用語は任意の共通のエンドヌクレアーゼをもつ前記ポリヌクレオチドの処理によって生成された生成物を指す。

【００５８】

本発明に従って、配列に言及する場合、「同一性パーセント」または「同一パーセント」という用語は、比較する配列（「比較配列」）を報告済みまたは請求項の配列（「参照配列」）とアラインメントした後に、ある配列を、報告済みまたは請求項の配列と比較することを意味する。続いて、同一性パーセントは次式により決定される:

同一性パーセント＝100［I－（C/R）］

Cは、参照配列と比較配列間でアラインメントした長さにおいて、参照配列と比較配列間とで異なる残基数を示し、ここで、

（i）比較配列上で相当するアラインメントした塩基やアミノ酸を持たない参照配列の各塩基またはアミノ酸、および

（ii）参照配列の各欠落部、および

（iii）比較配列のアラインメントした塩基あるいはアミノ酸とは異なる、参照配列のアラインメントした各塩基あるいはアミノ酸が差の構成要素となっており、

Rは、塩基またはアミノ酸としても数えられ、参照配列に作られた任意の欠落部を伴い、比較配列とアラインメントした長さにおいて、参照配列の塩基またはアミノ酸の数である。

【００５９】

もし、比較配列と参照配列の間に一致があり、上記のように計算した同一性パーセントが、指定の最小同一性パーセント以上である場合、たとえ、本明細書で上述の計算した同一性パーセントが指定の同一パーセントより小さい一致がある可能性があったとしても、比較配列は参照配列に対し指定の最小同一性パーセントを有する。

【００６０】

本願で開示される本来のペプチドは、特に記載されない限り、ペプチド鎖内で異なる、おそらく選択された部位において、一つまたは複数残基の置換によって修飾できる。そのような置換は保存的であってもよく、例えば、疎水性アミノ酸が別の疎水性アミノ酸に置き換わるように、1個のアミノ酸が類似構造および特性を持つアミノ酸に置換される。更に保存的な例として、ロイシンがイソロイシンに置換されるように、サイズおよび化学的性質が同一あるいは類似のアミノ酸に交換されることが考えられる。自然発生的な相同タンパク質ファミリーにおける配列多様性の研究において、ある種のアミノ酸置換は他のアミノ酸置換より認容性が高いことが多く、これらは元のアミノ酸とその置換物との間で、大きさ、電荷、極性、疎水性が類似の相関関係を示すことが多く、これが、「保存的置換」の定義の基礎である。

【００６１】

保存的置換は、本明細書では次の5グループの1つに交換されることと定義される：グループ１－分子量が小さい脂肪族の、非極性またはやや極性残基（Ala,Ser,Thr, Pro, Gly）；グループ2－極性、負電荷残基およびそれらのアミド類（Asp, Asn, Glu, Gln）；グループ3－極性、正電荷残基（His,Arg, Lys）；グループ4－分子量が大きい脂肪族の、非極性残基（Met, Leu, Ile, Val, Cys）；そしてグループ5－分子量が大きい、芳香残基（Phe、Tyr、Trp）。

【００６２】

より保存性の少ない保存的置換には、イソロイシン残基によるアラニンの置換のように、類似の特性を有するがサイズが多少異なる別の分子によるアミノ酸1置換を含む可能性も多少ある。非常に非保存的な置換には、酸性アミノ酸と極性アミノ酸、あるいは塩基性アミノ酸との置換を含む可能性も多少ある。しかしながら、化学的効果が完全には予想できないこと、また、過激な置換は他に単純な化学的原理から予想できない限り、思いがけ

ない効果を生じる可能性が多少あるため、そのような「過激な」置換は、効果がないと考えられるとは片付けることができない。

【００６３】

もちろん、そのような置換は、共通のL－アミノ酸以外の構造を含むこともある。そのため、D－アミノ酸は、本発明の抗原ペプチドで一般に見つかるL－アミノ酸の代わりに用いられ、依然として公表により本明細書に包含されている。更に、非標準R基（すなわち、自然タンパク質の一般的な20種類のアミノ酸に見られる以外のR基）を有するアミノ酸も、本発明によって免疫原および免疫原性ポリペプチドを生産する置換目的に使用されうる。

【００６４】

2つ以上の位置での置換が、以下に定義するように、実質的に同等かまたはより大きな抗原活性を有するペプチドに帰着することが分かっている場合、組み合わせた置換がペプチド抗原性への相加効果あるいは相乗効果に帰着するかを判断するために、これらの置換の組み合わせが検討される。ペプチド内で同時に置換されるのは多くても4箇所までであろう。

【００６５】

「T細胞応答」という用語は、invitroまたはin vivoにおいて、ペプチドによって引き起こされるエフェクター機能の特異的増殖および活性化を意味する。MHCクラスI拘束性ＣＴＬにおいて、エフェクター機能とはパルスしたペプチド、パルスしたペプチド前駆体、または自然状態でペプチドを提示した標的細胞の溶解、ペプチドによって誘導されるサイトカイン、好ましくはインターフェロン－γ、TNF－α、またはIL－2の分泌、エフェクター分子、好ましくはグランザイム、またはペプチドによって誘導されるパーフォリンの分泌、または脱顆粒のこともある。MHCクラスIIにより制御されるヘルパーT細胞において、エフェクター機能とはサイトカイン、好ましくはIFN－γ、TNF－α、IL－4、IL－5、IL－10またはIL－2のペプチド誘導性分泌、またはペプチド誘導性脱顆粒のこともある。ＣＴＬとヘルパーT細胞に対する考えられるエフェクター機能は、このリストだけに限定されない。

【００６６】

好ましくは、置換ペプチドについて、配列番号：１～３０のペプチドに特異的なＣＴＬを分析する際、バックグラウンドと比較して、溶解増加の最大値の半分に達する置換ペプチドのペプチド濃度は、1mM 程度、好ましくは1 μM 程度、より好ましくは約1 nM 程度、更により好ましくは約100 pM程度、最も好ましくは10 pM程度である。また、置換ペプチドが1つを超えた、少なくとも２つの個体からＣＴＬによって認識されることは好ましく、3つの個体ならさらに好ましい。

【００６７】

よって本発明におけるエピトープは、実質的に同一抗原活性を持つ限り、自然発生の腫瘍関連エピトープまたは腫瘍特異的エピトープと同一であってもよく、または、参照ペプチドと異なる残基が多くとも４個に留まるエピトープを含んでいてもよい。

【００６８】

免疫応答の刺激は、ホストの免疫システムにより異物であると認識された抗原が存在するかに依存する。腫瘍に関係した抗原の存在が発見されたことにより、ホストの免疫システムを利用して、腫瘍細胞表面に発現した標的抗原に特異的な免疫応答で、それにより作用メカニズムが、腫瘍の退化、静止、増殖速度の低下を引き起こすことが出来る、免疫応答を促進できる可能性が，現在でてきた。体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方を結びつける様々なメカニズムが、現在、癌の免疫療法において研究されつつある。

【００６９】

細胞性免疫応答の特定の要素は腫瘍細胞を特異的に認識し破壊することができる。細胞傷害性Ｔ細胞(ＣＴＬ)が腫瘍浸潤組織群や抹消血から単離されることから、このような細胞が癌に対する自然免疫反応において重要な働きをしていることが示唆されている((Cheever et al., 1993; Zeh, III et al., 1999)。 Galon らは、415 人名の大腸癌患者の標

本を用いた解析の結果、腫瘍組織内の免疫細胞の種類、密度および位置が、広く使用されている腫瘍のＴＮＭ分類よりも患者の生存率を推定するのに実際に良い指標であることを示した(Galon et al., 2006)。

【００７０】

MHC クラスＩは、主に内在性のタンパク質の分解により生成するペプチドである、DRIPおよびより大きなペプチドを示す。MHC クラス II 分子は、主にプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)に認められ、エンドサイトーシスの過程でAPCにより取り込まれた後処理される、外因性タンパクまたは膜貫通型タンパクのペプチドを主に与える(Cresswell,1994)。ペプチドと MHC クラス Ｉ 分子の複合体は、適切な TCR（Ｔ細胞レセプター）を持つ CD 8 陽性細胞傷害性T細胞により認識され、ペプチドとMHC クラス II 分子の複合体は、適切な TCR を持つ CD4 陽性ヘルパーT細胞により認識される。TCRとペプチドとMHC分子は１：１：１の量比で与えられることが良く知られている。

【００７１】

CD4陽性ヘルパーＴ細胞はCD8陽性細胞傷害性Ｔ細胞による有効な応答を誘導し維持するのに重要な働きをしているWangand Livingstone, 2003; Sun and Bevan, 2003; Shedlock and Shen, 2003)。最初に、リンパ節内のＣＴＬのプライミングと拡大は、CD4+T細胞によって支持される（Schoenberger et al., 1998）。その故、単一のメカニズムにより、未処理 CD8+ 細胞が機能的CD4+ T細胞－APC相互作用の場所に導かれる可能性も少しはある（Castellino et al., 2006）。最後に、機能的CD8+記憶細胞の世代は多くの場合、CD4+ T細胞の支援に依存している（Sunand Bevan, 2003; Janssen et al., 2003）。このことから、腫瘍関連抗原(TAA)由来のCD4陽性Ｔ細胞エピトープを同定することは、抗腫瘍性の免疫応答を始動させる薬剤を開発するのに大変重要である((Kobayashi et al., 2002; Qin et al., 2003; Gnjatic et al., 2003)。腫瘍部位で、Tヘルパー細胞はＣＴＬに調和するサイトカイン環境（Qinand Blankenstein, 2000; Mortara et al., 2006）を支持し、ＣＴＬS、NK細胞、マクロファージ、顆粒球などのエフェクター細胞を引き付ける（Marzoet al., 2000; Hwang et al., 2007）

【００７２】

MHCクラスII分子の発現は炎症がない場合、主に免疫応答の細胞、特にプロフェッショナル抗原提示細胞（APC）、例えば、単核球、単核球由来細胞、マクロファージ、樹状細胞に限られる。癌患者では、腫瘍細胞が驚くほど認められ、MHCクラス II 分子を発現している (Dengjel et al., 2006)。

【００７３】

マウスなどのモデル哺乳動物において、 ＣＴＬ エフェクター細胞（すなわちCD8陽性Ｔリンパ球）がなくとも、CD4陽性Ｔ細胞は、インターフェロンガンマ（IFNγ）の分泌による血管新生阻害を通じて、腫瘍の発現を阻害するのに十分であることが確認された (Qin andBlankenstein, 2000)。細胞傷害性CD4+ T細胞がリンホトキシンとグランザイムを通じて腫瘍細胞を直接殺すことも提言されている（Pennaet al., 1992; Littaua et al., 1992）。

【００７４】

更に、HLAクラスＩＩＩ分子が与える腫瘍関連抗原とペプチドとを認識するCD4陽性T細胞は、抗体（Ab）応答の誘導を通じて腫瘍の進行に対抗することが確認された(Kennedy et al., 2003)。

【００７５】

ＨＬＡクラスＩ分子に結合する腫瘍関連ペプチドと比較して、腫瘍関連抗原（TAA）クラスＩＩリガンドについてはこれまで少数しか説明されていない。

【００７６】

HLAクラス II分子の構成的発現は、通常免疫系の細胞に限られているため(Mach et al., 1996)、原発性腫瘍から直接クラス II ペプチドを単離することはできないと考えられていた。しかしながらDengjel らは最近、腫瘍から多数のMHCクラスIIエピトープを直接単離することに成功した(WO 2007/028574, EP 1 760 088 B1; (Dengjel et al., 2006))

。

【００７７】

腫瘍に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞に認識される抗原、つまり細胞傷害性Ｔ細胞のエピトープは、酵素、レセプター、転写因子などすべての種類のタンパク質から由来した分子であり、それらの分子は発現され、さらに起源が同一で変化していない細胞と比較して、各々の腫瘍細胞内でアップレギュレートされている。

【００７８】

腫瘍に関連する抗原についての分類は、現時点では以下にあげる主要グループからなる(Novellino et al., 2005)。

1. 癌-精巣抗原: 最初に同定された、T細胞が認識できるTAA(van der Bruggen et al., 1991)は、このクラスに属し、このクラスは、メンバーの発現が、組織学的に異なるヒト腫瘍および正常組織では、精巣の精母細胞／精原細胞および時折胎盤でのみ起きていることから、初めは癌-精巣(CT)抗原と呼ばれていた。精巣の細胞はClassIおよびCalss II のHLA分子を発現しないため、これらの抗原は通常の組織ではＴ細胞によって認識されず、よって免疫学的には腫瘍特異的であると考えられる。CT抗原として良く知られている例は、MAGEファミリーのメンバーまたはNY－ESO-1である。

2. 分化抗原：これらのTAAは腫瘍および腫瘍の発生源となった正常組織間で共有され、多くがメラノーマまたは正常のメラニン細胞内で見出されている。これらのメラニン細胞系列関連のタンパク質の多くはメラニンの生合成に関与しており、それゆえに腫瘍特異的でないにもかかわらず癌の免疫療法に広く使用されている。例として、チロシナーゼやMelan-A/MART-1がメラノーマに、ＰＳＡが前立腺癌に使用されているが、これだけには限定されない。

3. 過剰発現ＴＡＡ: 広く発現しているTAAをコードしている遺伝子は組織学的に異なる型の腫瘍で検出され、また正常組織でも低い発現レベルで検出される。正常細胞により処理され潜在的に提示されるエピトープの多くがＴ細胞に認識される閾値を下回っているが、一方、これらの腫瘍細胞の過剰発現が以前に獲得された耐性を破って抗癌作用を始動させる可能性はありうる。このクラスのTAAの代表例は、Her－2/neu, サバイビン、テロメラーゼおよびＷＴ１である。

4. 腫瘍特異的抗原:これらの特有のTAAは正常の遺伝子（例えばβカテニン,CDK4など）の突然変異により生じる。これらの分子変化の一部は腫瘍性形質転換と進行の両方又は一方に関与している。腫瘍特異抗原は正常組織に対する自己免疫反応のリスクを持たずに、通常強い免疫応答を始動させることができる。一方、これらのTAAは多くの場合、これらが同定されたまさにその腫瘍のみに関連しており、通常、個々の多数の腫瘍間では共有されない。

5. 異常な翻訳後改変により生ずるTAA：このようなTAAは、腫瘍内で特異的でもなく過剰発現もされないタンパク質から生ずるにもかかわらず、腫瘍内で主に活性な翻訳後工程に関連する腫瘍となる。このクラスの例として、MUC1に関しては腫瘍細胞で新規エピトープに導く、変化したグリコシル化パターンや、腫瘍細胞に特異的または非特異的な、分解過程中のタンパク質スプライシングが挙げられる(Hanada et al., 2004; Vigneron et al., 2004) 。

6. 癌ウイルスタンパク質：これらのTAAは癌化の過程に重要な働きする可能性のあるウイルスタンパク質で、外来性（ヒト由来ではない）であるため、T細胞応答を喚起することができる。このようなタンパク質の例として、子宮頸癌で発現されるヒトのパピローマタイプ16ウイルスタンパク質, E6とE7がある。

【００７９】

タンパク質が腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原として細胞傷害性Tリンパ球に認識され、さらに、治療に使用されるには、特定の条件を満たしていなければならない。この抗原は主に腫瘍細胞から発現されるものであり、正常で健康な組織において比較的少量で発現されるものではない。個々の抗原はあるタイプの腫瘍に存在するだけでなく、濃度（つまり、1細胞あたりの各々のペプチドのコピー数）が高いことが更に好ましい。腫瘍特異抗

原および腫瘍関連抗原は、例えば細胞周期調節やアポトーシス抑制のような機能を原因とする、正常細胞から腫瘍細胞への転換に直接関わるタンパク質から生ずる。更に、転換の直接原因となるタンパク質の下流ターゲットはアップレギュレートされるため、腫瘍には間接的に関連している可能性がある。このような間接的腫瘍関連抗原は、ワクチン療法のターゲットにもなることがある(Singh-Jasuja et al., 2004)。両方の場合とも、エピトープが抗原のアミノ酸配列に存在することが不可欠である。というのは、このような腫瘍関連抗原由来のペプチド（“免疫学的ペプチド”）が、in vitroまたは in vivoでＴ細胞応答を引き起こすはずだからである。

【００８０】

基本的に、MHC分子に結合できるいずれのペプチドも、T細胞エピトープとして機能しうる。in viro またはin vivo においてT細胞応答を誘導するには、対応するTCRを有するT細胞の存在と、さらにこの固有エピトープに対する免疫学的耐性の欠損が必須条件である。

【００８１】

そのため、TAAは腫瘍ワクチンの開発における出発点である。TAAを同定、および特性を示す方法は、患者または健康な被験者から単離できるＣＴＬを使用することに基づくか、または腫瘍と正常組織の間の異なる転写プロファイルまたは異なるペプチド発現パターンの生成に基づいている(Lemmel et al., 2004; Weinschenk et al., 2002)。

【００８２】

しかしながら、腫瘍組織またはヒト腫瘍細胞株に過剰発現しているか、選択的にそのような組織や細胞株に発現している遺伝子の同定では、免疫療法でこれらの遺伝子から転写中の抗原を利用することに関して正確な情報は得られない。これは、対応するTCRを持つＴ細胞の存在が必要であり、また、この特定エピトープに対する免疫耐性の欠損、または最小化が必要であることから、これらの抗原エピトープの個々の亜集団のみがそのような用途に適しているからである。それゆえ、機能的Ｔ細胞が認められるMHC分子と結合した状態で存在する、過剰発現または選択的に発現しているタンパクから生ペプチドのみを選択することが重要となる。そのような機能的Ｔ細胞は、特異抗原の刺激によって、クローンを増やし、エフェクター機能を行使できるＴ細胞として定義される（「エフェクターＴ細胞」）。

【００８３】

ヘルパーT細胞は、抗腫瘍免疫において、ＣＴＬのエフェクター機能を統合する際に重要な役割を果たす。T_{H1} タイプのヘルパーＴ細胞応答を始動させるヘルパーＴ細胞エピトープは、腫瘍関連ペプチド/MHC複合体を細胞表面に有している腫瘍細胞に対する傷害機能など、CD8陽性キラーＴ細胞のエフェクター機能をサポートしている。このようにして、腫瘍関連ヘルパーＴ細胞ペプチドのエピトープは、単独または他の主要関連ペプチドと共に、抗腫瘍免疫応答を刺激するワクチン組成物の薬剤有効成分として働く。

【００８４】

CD8およびCD4依存型の2つの免疫応答タイプは共に、連携し相乗して抗腫瘍効果に寄与しているため、CD8陽性ＣＴＬ（リガンド：MHCクラスI 分子＋ペプチドエピトープ）またはCD4陽性ヘルパーＴ細胞（リガンド：MHCクラス II 分子＋ペプチドエピトープ）のいずれかを利用した腫瘍関連抗原の同定、および特徴づけは腫瘍ワクチンの開発に重要である。

【００８５】

重度な副作用と癌治療における予後と診断に関連する費用を考慮することは必要不可欠である。それ故、癌、特に神経膠芽細胞腫に対するバイオマーカーを代表する他の要因を同定する必要がある。さらに、癌特に神経膠芽細胞腫で使用されうる要因を同定することも必要である。

【００８６】

さらに、前立腺全摘術後、局所進行性癌の増殖があり、腫瘍の原発部位での残存が通常原因である生化学的な再発を伴う、前立腺癌患者に対する治療デザインは確立されていな

い。現在使用で治療方法に比べ、治療の有効性は匹敵しているが死亡率が低い新たな治療方法が望ましいのである。

【００８７】

本発明は、神経膠芽細胞腫、前立腺癌、およびサービビンおよび／またはCSPを発現する他の腫瘍の治療に有益なペプチド、あるいは本発明の他のペプチドを提供する。これらのペプチドは、ヒト初代神経膠芽細胞腫試料上でHLA分子によって（例１および図１）、あるいはSYFPEITHI予想アルゴリズム（Rammensee et al., 1995）に従うと、HLA-DR対立遺伝子であるHLA-DRB1*01、DRB1*03、DRB1*04、DRB1*11、およびDRB1*15への無差別バイダーであることが予測される配列番号:26の場合に、天然に提示されることが質量分析法により直接示された。

このデータとこれらの頻繁に発生するDRB1対立遺伝子の頻度に基づき、A*02陽性白人の92%は、配列番号:26に記載のペプチドに結合するDRB1対立遺伝子の少なくとも１つを発現することが仮定されうる。

【００８８】

配列番号:26～30が誘導される原遺伝子（ｓｏｕｒｃｅ　ｇｅｎｅ）は、正常組織に比べて、神経膠芽細胞腫、前立腺腫瘍、乳癌、食道癌、大腸癌、腎明細胞癌、肺癌、中枢神経系癌、卵巣癌、メラノーマ（Tammet al.1998）、膵臓癌、扁平上皮細胞癌、白血球および髄芽腫で高く過剰発現されることが示され（実施例２と図２参照）、そのペプチドの腫瘍への関与が高いことを明示しており、例としてこれらのペプチドは腫瘍組織で多いに認められるが正常組織では見られないことが挙げられる。WO2004/067023では、腫瘍関連抗原サービビンに由来するMHCクラスI拘束性ペプチドについて報告しており、このペプチドは高い親和性でクラスIHLA分子に結合できる。

【００８９】

免疫系、とくにTリンパ球/T細胞は、ＨＬＡと結合したペプチドを認識できる。T細胞は、例えば 由来ペプチドを提示する神経膠芽細胞腫の腫瘍細胞など、認識されうるHLA/ペプチド複合体を提示する細胞を破壊できる。サービビン由来ペプチドにより活性化されたＴヘルパー細胞は、腫瘍の脈管化を阻害でき、免疫系のエフェクター細胞を引きつけることができ、ＣＴＬプライミング、増殖、CD+8Ｔ細胞応答の維持を容易にさせる。

【００９０】

本発明のうち、すべてのペプチドについてＴ細胞応答の促進能力が示されている（実施例３および図３を参照）。したがってこれらのペプチドは、患者の腫瘍細胞を破壊できる免疫応答を起こすことができるため有用である。上記のペプチド、または適当な前駆体（例えば伸張ペプチド、タンパク質またはこれらのペプチドをコードする核酸）を、理想的には免疫原性を促進する薬剤（例えばアジュバントなど）とともに直接患者に投与して、患者の免疫応答は誘導できる。本発明の標的ペプチドは、正常組織では同程度のコピー数で提示されず、患者の正常細胞に対する不要な自己免疫反応を抑制できるため、このような治療的ワクチンの接種で誘導された免疫反応は、腫瘍細胞に極めて特異的であることが期待できる。

【００９１】

前記医薬組成物は、遊離型のペプチドあるいは薬学的に許容される塩型のペプチドのいずれかを含む。

【００９２】

ここに使用されるような「薬学的に許容される塩」は、開示されたペプチドの誘導体を言い、前記ペプチドは、作用薬の酸性または塩基性塩を調製することにより修飾される。例えば、酸性塩は、適切な酸との反応に関与する遊離塩基（通常、中性型の薬物は中性NH_2基を持つ）から調製される。酸性塩の調製に適当な酸は、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸など）だけでなく、有機酸（例えば、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、ピルビン酸、シュウ酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p－トルエンスルホン酸、サリチル酸など）も含む。反対に、ペプチドに存

在する酸部分の塩基性塩の調製は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、トリメチルアミンのような薬学的に許容される塩基を使用して調製される。

【００９３】

特に好ましい実施態様では、製薬組成物は酢酸(酢酸塩)あるいは塩酸(塩化物)の塩類としてペプチドを含む。

【００９４】

本発明のペプチドは癌の治療に有効であるのに加えて、診断にも有効である。前記ペプチドは神経膠芽細胞腫から作製し、しかも正常組織には存在しないことが判明しているため、癌の有無を診断するために使用できる。

【００９５】

組織生検において請求項に記載のペプチドの存在を、病理学者の腫瘍診断に役立てることができる。病理学者は、抗体、マススペクトロメトリー、または当該分野で既知の他の方法を用いてペプチドを検出し、その組織が悪性または炎症性、あるいは病変組織であるかを判断できる。ペプチドのグループが存在すれば、病変組織の分類または下位分類ができる。

【００９６】

特に、Ｔリンパ球が既知で、またはＴリンパ球が作用機序に関わっていると予想される場合は、病変組織標本でペプチドを検出することにより、免疫学的療法の有効性を決定できる。MHCの発現欠失は、感染した悪性腫瘍細胞が免疫学的監視から逃れる、十分報告されたメカニズムである。したがって、ペプチドの存在は、この機序が分析した細胞により使用されていないことを示している。

【００９７】

ペプチドを使用して、ペプチドまたはMHC分子に結合したペプチドに対するＴ細胞応答や抗体応答のような、リンパ球応答を分析することもたまにある。これらのリンパ球応答は、それ以上の治療段階を決定する際、予後マーカーとして使用できる。これらの応答は、タンパク質ワクチン、核酸、自己物質、リンパ球養子免疫療法など異なる方法を使った、リンパ球応答の誘導を目的とした免疫療法的アプローチにおいて、代理マーカーとしても利用できる。遺伝療法において、副作用を評価する際、ペプチドに対するリンパ球応答を考慮できる。また、リンパ球応答を監視することで、移植片対宿主病および宿主対移植片病を検出するなど、移植治療の追跡検査に有効であるかもしれない。

【００９８】

ペプチドは、MHC/ペプチド複合体の特異的抗体を生成/開発するのに利用できる。これらは毒物や放射性物質を、病変組織に対する標的として治療に利用できる。これらの抗体の別な用途として、PETなどの画像を得るために、放射線核種を病変組織対して標的とすることができる。これによって、小さな転移の検出、サイズの測定、病変組織の正確な場所の決定などができる。

【００９９】

更に、生検試料に基に病理学者が腫瘍診断を検証するのにこれらを利用できる。

【０１００】

表１は、本発明に記載のペプチド、各々の配列番号、ペプチド結合に対するHLA 対立遺伝子、ペプチド由来タンパク質を示すものである。特に関心があるのは、配列番号:１に記載のペプチドがHLA-A*02と同様にHLA-DRに結合し、1つの異なる応答を引き出すという事実である。

【０１０１】

表１：本発明のペプチド

【表１】

配列番号	ペプチドコード	配列	ＨＬＡ対立遺伝子	由来タンパク質
1	NLGN4X-001	NLDTLMTYV	HLA-A*02	NLGN4X
2	SLCO1C1-001	YLIAGIISL	HLA-A*02	SLCO1C1
3	ACS-001	KIMERIQEV	HLA-A*02	ACSBG1
4	BCA-001	FLGDPPEKL	HLA-A*02	BCAN
5	BCA-002	ALWAWPSEL	HLA-A*02	BCAN
6	CHI3L1-010	TLYGMLNTL	HLA-A*02	CHI3L1
7	CLIP2-001	SLNELRVLL	HLA-A*02	CLIP2
8	DTNA-001	KLQDEAYQV	HLA-A*02	DTNA
9	EGFR-007	ALAVLSNYDA	HLA-A*02	EGFR
10	FABP7-001	LTFGDVVAV	HLA-A*02	FABP7
11	GFAP-001	NLAQDLATV	HLA-A*02	GFAP
12	GPR56-002	FLLSEPVAL	HLA-A*02	GPR56
13	GRI-001	NILEQIVSV	HLA-A*02	GRIA4
14	IGF2BP3-001	KIQEILTQV	HLA-A*02	IGF2BP3
15	MLC-001	SVVEVIAGI	HLA-A*02	MLC1
16	NES-001	GLQSQIAQV	HLA-A*02	NES
17	NES-002	SLQENLESL	HLA-A*02	NES
18	NES-003	FLFPGTENQEL	HLA-A*02	NES
19	NES-004	NLAEELEGV	HLA-A*02	NES
20	NR2E1-001	KIISEIQAL	HLA-A*02	NR2E1
21	NRCAM-001	GLWHHQTEV	HLA-A*02	NRCAM
22	PDPN-001	TLVGIIVGV	HLA-A*02	PDPN
23	TNC-001	AMTQLLAGV	HLA-A*02	TNC
24	TNC-002	QLLAGVFLA	HLA-A*02	TNC
25	CSP-001	TMLARLASA	HLA-A*02	CSPG4
26	BIR-002	TLGEFLKLDRERAKN	HLA-DR and HLA-A*02	BIRC5/Survivin
27	BIR-002a	TLGEFLKLDRERAKD	HLA-DR	BIRC5/Survivin
28	BIR-002b	FTELTLGEF	HLA-A1	BIRC5/Survivin
29	BIR-002c	LMLGEFLKL	HLA-A2	BIRC5/Survivin
30	BIR-002d	EPDLAQCFY	HLA-B35	BIRC5/Survivin

【０１０２】

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4（CSPG4）

CSPG4(コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)は、血管新生で機能的役割を持つ新生周

皮細胞上の内在性膜コンドロイチン硫酸プロテオグリカンを意味する(Ozerdem, 2006)。胚形成中に、 CSPG4 プロテオグリカンは未熟な末梢血管で発現されるが、血管が成熟するときこの発現は失われる。これは、腫瘍細胞の増殖、遊走、浸潤の刺激に関係する、初期の細胞表面メラノーマ進行マーカーとしても知られている。CSPG4は、ヒトメラノーマ病変の90％超で強く発現される。CSPG4は厳密には腫瘍に特異的なものではないが、メラノーマ患者および健常者の腫瘍反応性CD4+T細胞応答は、自己免疫を伴わずに、HLA-DR11発現メラノーマ細胞の$CSPG4_{693-709}$を認識する (Erfurt et al.,2007)。

【０１０３】

CSPG4の発現は、インテグリンが介在する細胞拡散、FAK（焦点接着キナーゼ）のリン酸化、ERK1/2（細胞外シグナル調節キナーゼ）の活性化を促進する(Yang et al., 2004)。更にCSPG4が腫瘍の血管形成に重要な役割を果たしているという、in vitroデータの蓄積した根拠がある。そのため、CSPG4陽性腫瘍は血管新生の速度と血管容量が有意に上昇していることが分かり、CSPG4はアンギオスタチンを隔離することが示されたが、アンギオスタチンは通常、内皮細胞の増殖と血管形成を抑制する。未熟な血管にはCSPG4陽性周皮細胞も含まれることから、この細胞群には血管発生時にアンギオテンシンの抑制効果を遮断することで、内皮細胞増殖を調節する役割があることが示唆される(Chekenya et al., 2002b)。

【０１０４】

CSPG4の発現は、内皮細胞、軟骨細胞、平滑筋細胞、上皮内にある特定の基底ケラチン生成細胞、および毛包内の細胞など、活性化された周皮細胞に加え、一部の正常組織でも報告された(Campoli et al., 2004)。

【０１０５】

血管形成中、およびCNSの病状に反応し、高度な運動性を持つCSPG4細胞が急速な形態変化を受け、血管の増殖と修復が発生している箇所に補充される。CSPG4は、悪性脳腫瘍の血管に存在する腫瘍細胞と周皮細胞の両方で過剰発現される(Chekenya and Pilkington, 2002)。CSPG4陽性ヒト神経膠腫細胞株の細胞を免疫不全ヌードラットの脳に移植することで、これらの腫瘍は微小血管密度が対照と比較して高いことが示され、CSPG4の発現が宿主由来の腫瘍血管系の機能と構造をいずれも制御していることを意味している(Brekke et al., 2006)。GBM球状生検の異種移植片をヌードラットに移植する実験では、CSPG4が周皮細胞および腫瘍血管系の基底膜成分両方の血管と主に関連していることが同定され、その発現は細胞増殖が高い部位とも関連していた(Chekenya et al., 2002a)。更に、CSPG4の発現は、神経膠腫移植モデルの腫瘍進行に対応していた (Wiranowska et al.,2006)。悪性の進行は、腫瘍とその間質とのクロストークによって維持され、活性化された間質は血管新生、細胞外基質成分、刺激性増殖因子を提供することで、増殖性、浸潤性の腫瘍細胞を育む。この状況において、CSPG4は細胞接着、遊走、増殖、血管の形態形成の変化により、腫瘍間質の活性化に重要な役割を果たしている(Chekenya and Immervoll, 2007)。

【０１０６】

CSPG4は低グレードの神経膠腫と比較し、高い発現率でヒト神経膠腫に特異的に発現される(Chekenya et al., 1999)。CSPG4の発現率が高いことは、α3β1インテグリン／PI3Kシグナル伝達およびその下流の標的の活性化亢進が介在する多剤耐性と関連があり、細胞生存を促す(Chekenya et al., 2008)。

【０１０７】

CSP-001は、以下の器官/組織および癌において認められた。

脳：- 神経膠芽細胞腫； - 続発性神経膠芽細胞腫（星状細胞腫に由来)
大腸癌：- 腺癌（粘液性タイプは除く)、原発性
直腸：腺癌、転移性
胃：- 腺癌（印環細胞タイプは除く)、原発性
腎臓：- 腎細胞癌、 - 腎細胞癌、明細胞タイプ、転移性、すべての続発性部位、-腎細胞癌、明細胞タイプ、原発性、 - 腎細胞、原発性
肺：- 腺癌、原発性、 - 扁平上皮癌、原発性、- 原発性癌、 - 小細胞性癌、- 扁平上皮

癌、原発性;
膵臓：- 腺癌、原発性、 - 膵島細胞腫、悪性、転移性
前立腺：- 腺癌、原発性
皮膚：- 転移性悪性メラノーマ、リンパ節転移性
【０１０８】
それ故、配列番号：１ に記載のペプチドを含む医薬組成物は、特に以下の治療に好ましい。
脳：- 神経膠芽細胞腫； - 続発性神経膠芽細胞腫（星状細胞腫に由来）
大腸癌：- 腺癌（粘液性タイプは除く）、原発性
直腸：腺癌、転移性
胃：- 腺癌（印環細胞タイプは除く）、原発性
腎臓：- 腎細胞癌、細胞株、腎細胞癌、明細胞タイプ、転移性、すべての続発性部位、腎細胞癌、明細胞タイプ、原発性、腎細胞癌、原発性
肺：- 腺癌、原発性、病期Ｉ - 扁平上皮癌、原発性、- 原発性癌、 -小細胞性癌、- 扁平上皮癌、原発性 、
膵臓：- 腺癌、原発性、 - 膵島細胞腫、悪性、転移性
前立腺：- 腺癌、原発性
皮膚：- 転移性悪性メラノーマ、リンパ節転移性
【０１０９】
アシル-CoA合成酵素バブルガムファミリー1（ACSBG1）
この遺伝子によってコードされたタンパク質は、長鎖アシルCoA合成酵素活性を有する。非常に長鎖な脂肪酸の代謝とミエリン形成の活性化に対し、脳で中心的役割を果たしていると考えられている。チオエステル化反応による脂肪酸のアシルCoAへの活性化は、このクラスの分子が関与する殆どの反応に必須条件である。癌特異性機能または過剰発現は文献ではいまだに説明されていない。脳、副腎、睾丸、卵巣とその機能におけるACSBG1の発現パターンは、Ｘ連鎖性副腎白質ジストロフィー（XALD）の生化学的病理でのこのタンパク質の役割を示唆している。XALD は、非常に長鎖な飽和脂肪酸の血漿および組織レベルが上昇することを特徴とする、重度で死に至ることが多い、神経変性病である。
【０１１０】
ブレビカン（BCAN）
ブレビカンは出生時から8歳までは高く発現され、20歳までに低レベルにダウンレギュレートされ、正常成人の大脳皮質ではこのレベルが維持される細胞外基質タンパク質である。GPIアイソフォームは、発達中、一様に低レベルで発現される(Gary et al., 2000)。悪性神経膠腫は、組織または腫瘍特異的な細胞外タンパク質により仲介されると思われる周囲の正常脳を積極的に攻撃する。そのため、細胞外基質は、組織から細胞への移動の許容性を一部調節可能である。したがって、CNSのECM を修飾する神経膠腫の能力により、これらの細胞の攻撃性は仲立ちされる。神経膠腫内でドラマチックにアップレギュレーションを示す1つの ECM 分子がBCAN、つまり脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。BCAN の発現は、脳損傷を発症時とその後でのグリア細胞の運動性が増大する期間中にもアップレギュレートされる。神経膠腫では発現が正常レベルの約7倍増大することが検出される（Gary et al., 2000; Gary et al., 1998）。神経膠腫におけるBCANのアップレギュレーションに加え、全長タンパク質のタンパク質プロセシングも浸潤に寄与している可能性がある(Gary et al., 1998; Nutt et al., 2001)。ADAMTSファミリーのメタロプロテアーゼによるBCANのタンパク質分解プロセスが、神経膠腫での浸潤促進作用に介在する上で必要な段階であることが示されるであろう。BCANの突然変異体、「非開裂」型は、in vitroで神経膠腫細胞浸潤を、in vivoで腫瘍進行を高めることはできない（Viapiano et al.,2008）。BCANのmRNA は、正常成人の皮質内あるいはいずれの非神経膠腫において検出されず、よって BCAN は、神経膠腫内のユニークで選択的なマーカーであると考えられている（Jaworskiet al., 1996）。さらに、タンパク質分析により、BCAN全長の発現の増大ばかりでなく、神経膠腫内で別のユニークなアイソフォームが存在することも分

かった。従って、B/b$_{\Delta g}$はコアタンパク質の糖化が不完全であるか、抑制されて発生したBCANmRNAの全長生成物である。B/b$_{\Delta g}$ 正常成人脳には存在しないが、グレードが高い神経膠腫試料には認められる（Viapiano etal., 2005）。

【０１１１】

BCAN は、神経膠芽細胞腫由来の幹様腫瘍細胞のタイプでは、選択的に過剰発現されると説明されてきた（Guntheret al., 2008）。幹様細胞のこのサブタイプは、in vivoで多能性および腫瘍原性が最も高いことを示した。

【０１１２】

キチナーゼ 3様 1 タンパク質（cartilageglycoprotein-39）（CHI3L1）

CHI3L1は「ほ乳類キチナーセ様タンパク質」メンバーであり、数種のタイプの固形腫瘍により発現され分泌される。それは、癌細胞と腫瘍関連マクロファージにより生成され、組織の再モデルプロセスに関与する細胞成長因子の作用を示す。また、癌細胞の増殖、分化、生存、浸潤、転移、血管形成、腫瘍周辺の細胞外基質の炎症と再モデル化において役割を果たしている可能性も多少はある（Johansenet al., 2006; Johansen et al., 2007; Ringsholt et al., 2007）。その上、CHI3L1 はリューマチ性関節炎の自己抗原の候補でもある。健常ドナーのCHI3L1有向性CD4T 細胞株は、CD25、糖質コルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体、Foxp3 を発現し、抗原特異的 T 細胞応答を抑制することができた。リューマチ性関節炎患者の50% が炎症性Tヘルパー1表現型に向かった分極を呈し、抗原特異的リコール応答力が有意に減少する（van Bilsen et al., 2004）。

【０１１３】

CHI3L1は細胞ストレスの結果として、神経系で誘導されることが知られているオンコスタチンMによってアップレギュレートされ、殆どのヒト脳腫瘍で発現され、JAK/STAT シグナル経路を活性化する（Kronaet al., 2007）。CHI3L1 発現も神経膠芽細胞腫内の p-MAPK、p-mTORおよびp-p70S6Kの発現に関連していた。

【０１１４】

数件の遺伝子発現研究で、CHI3L1 は神経膠芽細胞腫内では、正常脳に比べ3～62倍の上昇範囲で発現が高いことが示された（Saidiet al., 2007; Kroes et al., 2007; Shostak et al., 2003; Tanwar et al., 2002）。免疫組織化学的研究では、機能核を有する細胞すべてが細胞質内でCHI3L1 を発現できるが、CHI3L1発現の強さは細胞活性に依存することを明らかにした。よって、高い代謝活性を呈することが知られている細胞が、細胞質染色で最も強い染色度を示す傾向であった（Ringsholtet al., 2007）。さらに、神経膠芽細胞腫は未分化の稀突起膠細胞腫よりも非常に多くの CHI3L1 発現を示すことが、免疫組織化学研究から分かる可能性がある。CHI3L1タンパク質レベルを試験するための神経膠腫試料のウェスタンブロットでは、 65%のGBMで相当量上昇し、グレードの低い神経膠腫（グレードIIとIII）または正常の脳組織では検出されないレベルであることを示した。転移せず手術によって治癒可能な毛様細胞性星細胞腫と違って、神経膠芽細胞腫のみがCHI3L1を発現する(Colin et al., 2006)。

【０１１５】

CHI3L1 の血清レベルは多様な悪性腫瘍で上昇し、生存率がよくないことに関連づけられている。CHI3L1の最高血清濃度は、無再発期間と全生存期間が最も短い転移性癌患者で認められた。神経膠芽細胞腫患者の血清では特に CHI3L1発現が上昇した（Kim etal., 2007; Johansen et al., 2007; Johansen et al., 2006; Junker et al., 2005;Tanwar et al., 2002）。活性腫瘍を持つGBM 患者は、疾病のX線根拠のない患者よりも CHI3L1 濃度が有意に高い。さらに、多形性神経膠芽細胞腫患者でCHI3L1 と 生存率間に有意な逆相関がある（Hormigo et al., 2006; Pelloski et al., 2005）。

【０１１６】

さらに、CHI3L1発現の上昇が乳癌で観察されうる。乳癌ではCHI3L1発現は、大きな腫瘍サイズ、未熟腫瘍分化、さら無病生存率の悪化と相関している（Kimet al., 2007; Coskun et al., 2007）。さらに、脳と首の扁平上皮癌では、その53%でCHI3L1の血清 濃度上昇が検出された。CHI3L1の血清濃度が高い患者は、正常値の患者に比べて生存期間が短かっ

た（33ヶ月 vs. 84ヶ月）（Roslind et al., 2008）。

【０１１７】

前立腺癌に罹患している患者は BPH 患者または健常人に比べてCHI3L1の血清濃度が有意に高かった（Kucur et al., 2008）。

【０１１８】

CAP-GLY リンカータンパク質2含有CAP-GLYドメイン（CLIP2）

CLIP2によりコードされたタンパク質は細胞質リンカータンパク質ファミリーに属しており、このファミリーは特異的な膜オルガネラと微小管との間の相互作用を仲介することが提示されている。CLIP2は微小管と樹枝状層状体と呼ばれるオルガネラの両方に、関連していることが示された（NCBIウェブページからの一般的情報）。

【０１１９】

CLIP2はチロシン化された微小管端に局在するが、脱チロシン化された微小管端には局在しない。チューブリン－チロシンリガーゼ（TTL）は、C末端チロシン残基のチューブリンチロシン化サイクル中のαチューブリンへの添加を触媒する酵素であり、腫瘍進行に関与し、神経組織で極めて重要な役割を果たしている（Periset al., 2006）原発性神経膠芽細胞腫30症例の凍結切片を用いたGenoSensor Array 300 によるゲノムDNA 研究の1つが、ゲノム全体の遺伝子増幅、遺伝子欠失、および染色体情報のキャラクタリゼーションを行った。頻繁に増幅される遺伝子には、=CLIP2（63.3%）、EGFR（53.3%）、IL6（53.3%）、ABCB1 （MDR1）（36.7%）、およびPDGFRA（26.7%）が含まれていた（Suzuki et al., 2004）。

【０１２０】

溶質キャリア有機アニオントランスポーターファミリー、メンバー 1C1（SLCO1C1）

SLCO1C1は、脳血管バリアで選択的に発現される（Chu et al., 2008）。SLCO1C1は、選択的な基質優先を行い、脳および睾丸中の甲状腺ホルモンの性質に重要な役割りを果たしている可能性がある（Pizzagalli et al., 2002）。SLCO1C1 は、免疫蛍光法により特異的に検出されなかった。SLCO1A2 と SLCO2B1 は、血液脳関門と脳腫瘍関門を形成する内皮細胞の管腔膜中で免疫蛍光顕微鏡により検出可能であったが、神経膠腫細胞中では検出できなかった（Bronger et al., 2005）。

【０１２１】

ジストロブレビンα（DTNA）

αジストロベレビンは、骨格筋細胞中のジストロフィン－糖タンパク質複合体の細胞質成分として最初に説明された。DTNAのアイソフォームは、細胞と組織中で別の場所に存在している。つまり、内皮細胞中の基底外側膜、ジストロブレビンが仲介する細胞外基質接触部、周辺タンパク質と膜貫通タンパク質、および繊維状アクチン細胞骨格などである。DTNAはその構造的役割以外に、細胞シグナリングと細胞分化で重要であると仮定され、さらのその再編成中の結合の堅さに関連している（Sjo et al., 2005）。DTNA は、シナプスの形成および安定性と、ニコチン性アセチルコリン受容体のクラスター形成に関与している可能性がある（Sjo et al., 2005）。

【０１２２】

上皮細胞増殖因子（赤芽球性白血病バイアル腫瘍遺伝子ホモログ、アビアン）（EGFR）

最近着目される領域は、上皮成長因子受容体（EGFR）についてである。理由は、その受容体の異常が神経膠芽細胞腫の最も一般的な分子異常の1つであるからである。特にEGFRvIII（上皮成長因子受容体の変異体III）は、神経膠芽細胞腫で一般的に発現される、EGFRの発癌性の構造的に活性な突然変異体型である（Zawrockiand Biernat, 2005）EGFR は、前駆細胞の表現型を調節する多数の経路の活性化に関与している。活性化されたEGFR チロシンキナーゼ活性は、神経幹細胞の移動、増殖、生存を促進する。EGFRシグナリングも、神経膠芽細胞腫で役割を果たしていることが知られているので、神経膠芽細胞腫は癌の幹細胞から由来しており、EGFR シグナルの多くがこれらの前駆体細胞変化を受けていると結論されうる（Yuso-Sacido et al., 2006）。

【０１２３】
原発性神経膠芽細胞腫は高齢患者で新規に発生し、EGFRを過剰発現することが多い。EGFRの過剰発現は、血管形成、浮腫、浸潤の増加と相関している（Aghi et al., 2005）。さらに、EGFRが増幅した神経膠芽細胞腫は、放射線に耐性であり（Barker et al., 2001）、治療後より早く再発する（Schlegel et al., 1994）。
【０１２４】
GBMは、EGFRの過剰発現が腫瘍成長と患者生存に関与し、EGFR活性化が GBM の浸潤を in vitroで促進させる、唯一のヒト非上皮細胞腫瘍である（Penar et al., 1997）。
【０１２５】
EGFRはerbBの癌原遺伝子である。EGFRの過剰発現は、活性なリガンド－受容体複合体の形成が増大するため細胞成長を促進させる。遺伝子増幅はGBM 腫瘍中のEGF受容体過剰発現の土台となるメカニズムである（Thompsonand Gill, 1985）染色体7上のGFR 遺伝子は、グレードの高い神経膠腫で頻繁にコピー数を増やすことが知られている。RNAの短い妨害によるEGFRの欠失により、神経膠芽細胞腫細胞の腫瘍形成は終了する（Huang et al., 2007）。
【０１２６】
EGFR過剰発現が40-70%のGBMで検出されるが、一方で、毛様細胞性、低グレードまたは未分化の星状細胞腫は常にEGFR 陰性である（Agosti et al., 1992; Schwechheimer et al., 1995; Eppenberger andMueller, 1994; Huncharek and Kupelnick, 2000; Liu et al., 2006a）。血清EGFRの濃度が高いと、生存が短くなることを示している（Quaranta et al., 2007）。さらに、高グレードの星状細胞腫を有する長期生存者は、EGFRvIII 陰性であることが示された（Liang et al.,2008）。
【０１２７】
Ｎｏｔｃｈ１はEGFR発現をアップレギュレートし、原発性高グレードヒト神経膠腫ではEGFRレベルとＮｏｔｃｈ１mRNA間に相関性が見られ得る（Purow et al., 2008）。EGFR自身が、神経膠腫を含む一部の腫瘍で増殖、生存、および腫瘍形成に寄与する、c-Jun NH_2 末端キナーゼ（JNK）の構造上の活性化に関与している（Li et al., 2008a）。
【０１２８】
EGFRvIIIはわずかな割合の神経膠腫細胞によって発現だけされるが、細胞の殆どは、形質転換した表現型を呈する。不活性な神経膠腫細胞におけるEGFRvIIIの発現はEGFRvIII含有脂質ラフトに関連する微小胞の形成を促進させるが、その微小胞は、細胞周辺に放出され、発癌作用の転移を導くEGFRvIIIが欠落した癌細胞の細胞膜と融合できる（Al-Nedawi et al., 2008）。
【０１２９】
脳型脂肪酸結合タンパク質7（FABP7）
脂肪酸結合タンパク質（FABP）は14～15kDaの細胞質タンパク質であり、脂肪酸（FA）の取り込み、輸送、標的化に関与していると想定されている。FABPは脂肪酸濃度を調節し、この方法で酵素、膜、イオンチャネルと受容体の機能、さらに遺伝子発現、細胞成長と分化に影響を与える可能性がある。9種のFABP タイプが特異的な組織分布から識別できる。これらは、アミノ酸配列の30～70% が同一であるにもかかわらず、脂肪酸が結合する3級に類似するβクラム構造を有する。神経組織には、時空間的分布が異なる4種のFABPタイプ類が含まれる(Veerkamp and Zimmerman, 2001)。FABP7 は脳と隔膜発生時に多く発現され、その発現は成人 CNSで有意に減少する（Godbout et al., 1998）。
in vitroの結果を基に、FABP7は発達中の脳放射状グリア細胞の構築には必要であることが示唆されている。正常な脳では、FABP7タンパク質はどうにか検出可能であるが、数種のGBMでは中等度から強度の核と細胞質の発現を示す。FABP7形質転換細胞は、対照細胞よりも5倍遊走能が高いことが示されている。従って、特に神経膠芽細胞腫でFABP7の過剰発現により全体的な生存年数が短くなるのは、周囲の脳実質への腫瘍細胞の遊走および浸潤が亢進したためと考えられる(Liang et al., 2005)。FABP7 の核への移行は、特異的に EGFR 増幅とより浸潤な腫瘍に関連している（Kaloshi et al.,2007）。そのため、核FAB

P7は、EGFR 活性化により誘導され、GBM腫瘍細胞の移動を促進する可能性がある。

【０１３０】

FABP7 発現腎細胞癌のマーカーであることも示されている。FABP7発現は癌組織のみで検出されるが、腎臓試料の非癌性部分では検出されない（Teratani et al., 2007）。腎細胞癌の FABP7 発現は、正常腎組織に比べ20倍高いことが示された（Domoto et al., 2007; Buchner et al., 2007）。FABP7 は細胞増殖と浸潤に関与すると思われるメラノーマでは頻繁に発現されることも示された（Goto et al., 2006）。

【０１３１】

グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）

GFAP は、成熟星状膠細胞の主要な中間径フィラメントタンパク質の1つをコードする。それは、発達中に星状膠細胞を他のグリア細胞と識別するマーカーとして使用される。この遺伝子の突然変異は、中枢神経系内の星状膠細胞による希な疾患である、Alexander病の原因となる。別な転写変異体が説明されているが、全長配列は決定されていない。その異性体レベルの上昇が自閉症患者の脳で報告されおり、一方重度な鬱病患者の脳ではGFAPの低下が見られた。

【０１３２】

全脳照射終了後10年で新たな腫瘍が発生した霊長類の脳が分析された。腫瘍前駆体は細胞の異型と有糸分裂を示し、また腫瘍関連マーカーである、GFAP、EGFR、およびp53は陰性であった。

【０１３３】

星状膠細胞新生物では、GFAP陽性細胞数と染色強度はグレード合いに直接比例する。稀突起膠細胞腫の3症例すべてがGFAP への反応は陰性であった（Reyaz et al., 2005）。純粋の稀突起膠細胞腫がGFAPに対し免疫組織学的に陰性である（Mokhtari etal., 2005）。グレードの高い神経膠腫患者のGFAP 血清濃度は、腫瘍容量と直接相関を示した（Brommel and et al., 2007）。GB患者間であっても、腫瘍容量、腫瘍壊死容量、壊死GFAP 陽性細胞量と血清 GFAP レベル間の有意な相関関係が検出されうる（Jung et al., 2007）。

【０１３４】

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤4フェニル酪酸で神経膠芽細胞種細胞株を処理後、非リン酸化 GFAP の濃度上昇が見られ、一方リン酸化アイソフォームはそのまま保持された（Asklund et al., 2004）。

【０１３５】

TGFαで処理した神経膠芽細胞腫細胞株において、GFAP遺伝子転写、mRNAレベル、および特異的タンパク質合成は、約 50%減少した（Zhou and Skalli, 2000）。

【０１３６】

技術的にはGFAPプロモーターがマウスモデルのツールとして頻繁に使用され、神経系に特異的な所望のタンパク質を誘導している。

【０１３７】

膵臓のランゲルハンス島は膵島周辺のシュワン細胞によってエンベロープされ、それがGFAPを発現させる。膵臓神経系組織要素の自己免疫標的が、天然型糖尿病タイプ１の不可欠で早期部分であるようにみえる。この膵臓発現は、immaticsに反映されず、またはバルク組織からの外部遺伝子発現データにより反映されない。GFAP-001は、I型糖尿病患者および糖尿病自己抗原に対する抗体反応を示す非糖尿病親族が（糖尿病のリスクが増大）、健常ドナーに比べ、グランザイムB分泌ＣＴＬ（ex vivo ELISPOT）の反応性を強化したエピトープとして発表された。

【０１３８】

興味深いことに、自己免疫疾患、特に糖尿病の徴候と神経膠腫発生リスクとの間には逆の相関があるように見える（Aronsonand Aronson, 1965; Schlehofer et al., 1999; Brenner et al., 2002; Schwartzbaum et al., 2003; Schwartzbaum et al., 2005）。

【０１３９】

Gタンパク質共役受容体 56（GPR56）

GPR56 は、異常に大きいN末端細胞外領域を伴う異型Gタンパク質共役受容体（GPCR）であり、それはムチン様ストークを形成するセリン/スレオニンが豊富な長領域を含み、この特徴故に、GPR56は細胞－細胞または細胞－基質相互作用で働いていると考えられている。mRNA の高い発現レベルとその広い分布が伴い、この受容体が細胞－細胞相互作用プロセスで役割を果たしている可能性が示唆されている（Liu et al., 1999）。GPR56 は、神経前駆体細胞の発生に役割を持つセクレチンファミリーのGPCRに属し、ヒト脳の発生障害に関与していた。GPR56のより高い発生は、正常な細胞形質転換表現型に比べ、数種の癌組織の対応する表現型と相関しており、これは発癌機能の可能性を暗示している。RNA 妨害により仲介される GPR56 スライシングは、結果としてアポトーシスの誘導、アノイキスの増大による癌細胞の足場非依存性成長を軽減するGPR56 のサイレンシングは、細胞外基質への細胞粘着を軽減させる（Ke et al., 2007）。GPR56 のアップレギュレーションは、機能的ゲノミクスによる多形性神経膠芽細胞腫で認められた。免疫組織化学的試験では、GPR56の発現が、正常成人脳では検出不可能な発現レベルで、大部分の神経膠芽細胞腫/星状膠細胞腫試料中で確認された（Shashidhar et al., 2005）。膵臓癌細胞で、GPR56mRNAが高いレベルで発現される一方、GPR56 タンパク質はこれらの細胞では無視できるか、検出不可である。このことは、GPR56 タンパク質の発現がヒト膵臓癌細胞中で抑制されることを示唆している（Huang et al., 2008）。転移に関する早期研究では、GPR56 はヒトメラノーマ細胞株の転移率の高い変異体において著しくダウンレギュレートされることを示唆し、GPR56の過剰発現が腫瘍成長と転移を抑制することを暗示した。この成長抑制は、GPR56 と、組織と間質に広範囲に存在する成分であり、腫瘍進行の抑制に関与している、組織トランスグルタミナーゼ（TG2）との相互作用により仲介されると考えられている（Xuet al., 2006; Xu and Hynes, 2007）。GPR56の別の抑制影響は、神経前駆体細胞（NPC）の移動において報告されている。GPR56はNPCで高く発現され、おそらくGalpha（12/13）と Rho シグナリング経路を通じて NPC の移動調節に関与しており、GPR56 が中枢神経系の発生に重要な役割を果たしていることを示唆している（Iguchi et al., 2008）。

【０１４０】

グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、AMPA4（GRIA4）

αアミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸(AMPA)-型グルタミン酸受容体（AMPAR）は中枢神経系興奮シナプスの迅速な神経伝達を仲介し、GluR1からGluR4までの4つのタンパク質セット（GRIA4）から得たサブユニットから構成される。

【０１４１】

GRIA4サブユニットは、ヒト神経膠芽細胞腫細胞で偏在的に発現され、Ca^{2+}-透過性AMPARとして働く。Ca^{2+}-透過性受容体に変換されると、細胞移動運動を阻害してアポトーシスを誘導し、一方Ca^{2+}-透過性AMPA受容体の過剰発現は、腫瘍細胞の移動と増殖を促進させる。それ故、Ca^{2+}-透過性AMPA受容体は、神経膠芽細胞腫の成長に不可欠な役割を有しているようにみえる（Ishiuchi et al., 2002）。

【０１４２】

インスリン様成長因子2 mRNA結合タンパク質3（IGF2BP3）

IGF2BP3はインスリン様成長因子II mRNA結合タンパク質ファミリーの一員であり、mRNAの局在化、代謝回転、翻訳調節に関係があるとされている。コードされたタンパク質にはいくつかのKHドメインが含まれ、RNA結合において重要であり、RNAの合成および代謝に関与していることが知られている。それは主に胚発生中に一部の腫瘍で発現される。そのため、IGF2BP3は癌胎児性タンパク質であると考えられている(Liao et al., 2005)。神経膠芽細胞腫でのIGF2BP3発現についての特異的情報は見出されていないが、IGF2BP3は他の数種の悪性腫瘍で過剰発現されると説明されている。そのため、IGF2BP3は、716件の分析された腎明細胞癌標本の30%で発現される。この試験では、発現が進行病期と原発性腫瘍グレード、腫瘍凝固壊死と肉腫様分化など他の有害特徴に関連していた。さらに、陽性IGF2BP3 の発現は、遠隔転移のリスクを5～10倍増大させ、RCCによる死亡リスクを42%-50%増大させることに関連していた。このことは、IGF2BP3発現が、悪性腎明細胞癌の挙動の独

立した予測因子であることを示唆している（Hoffmann et al., 2008; Jiang et al., 2006; Jiang et al., 2008）。またIGF2BP3の発現は、異形成の特徴がある場合でも、発現が確定されてない良性の母斑と比較し、悪性メラノーマで検出された(Pryor et al., 2008)。子宮内膜癌では、IGF2BP3の発現はII型子宮内膜癌および子宮内膜腫瘍病変間の浸潤性組織表現型に密接に関連している（Zheng et al., 2008）。食道扁平上皮細胞癌に罹患している20症例で、TIL、局所リンパ節リンパ球、および末梢血リンパ球中の特異的T細胞のHLA-A2402限定エピトープペプチドに対する応答誘導が、全例の40%で観察される可能性があるかもしれない（Mizukami et al., 2008）。IGF2BP3は膵臓癌でも多く発現される。2研究では、膵臓組織試料の90％超で免疫染色後にIGF2BP3発現が示されたが、非腫瘍性膵臓組織はIGF2BP3が陰性であった。さらに、IGF2BP3mRNA は、非癌性組織試料に比べ膵臓癌で過剰発現され、その発現は腫瘍病期とともに徐々に増大した（Yantiss et al., 2005; Yantiss et al., 2008）。IGF2BP3発現は高グレードの尿路上皮腫瘍で有意に増加することも分かったが、良性の尿路上皮または低グレードの尿路上皮腫瘍では一般に発現されない。更に、IGF2BP3陽性腫瘍患者はIGF2BP3陰性腫瘍患者よりも、無増悪生存率および無病生存率がはるかに低い。初期診断で表在性浸潤尿路上皮癌と診断されたIGF2BP3陽性患者も進行して転移したが、IGF2BP3陰性患者では転移しなかった。さらに、これらの試験データは、IGF2BP3が、乳頭および平坦両病変のグレードが低→高に変化する、尿路上皮腫瘍増悪に関与している可能性を示唆していた（Li et al., 2008b; Sitnikova et al., 2008）。

【０１４３】

皮質下嚢胞1を伴う巨脳症性白質脳症（MLC1）

皮質下嚢胞を伴う巨脳症性白質脳症（MLC）は、子供の常染色体劣性大脳白質障害である。MLCは、遺伝子MLC1の突然変異によって引き起こされる（Ilja Boor et al., 2006）。この研究者の理解に基づいた、脳腫瘍とMLC1 との関連に関する報告は文献では見あたらない。

【０１４４】

1件の論文がマウス脳でのMLC1の細胞局所分布を検討した（Schmitt et al., 2003）。MLC1の最も高い発現が、出産前と周産期に多能性神経前駆体細胞中で発見された。成体マウス脳で、MLC1 mRNAがグリア細胞中に独占的に検出された発生中と成熟した星状膠細胞に比べ、稀突起膠細胞はMLC1発現で欠けていた。

【０１４５】

ネスチン（NES）

発生中、すべてのCNS部分で受胎後11週に、脳室層の神経上皮細胞で中間径フィラメントの拡大発現があり、一方、ネスチン免疫活性は妊娠第2期と第3期中に減少する（Takano and Becker, 1997; Lendahl et al., 1990; Zimmerman et al., 1994; Tohyama et al.,1992）。増殖性脳質層から移動中または移動後、ネスチン発現は分裂後ニューロン中で急速にダウンレギュレートされる（Arnold andTrojanowski, 1996）。非腫瘍性ヒト成人脳組織のネスチン染色は、非常に少ない内皮細胞数の薄い色のみを示した（Dahlstrand et al.,1992）。ネスチンは腫瘍性転換中に発現されうる（Veselska et al., 2006）。神経膠腫組織で、ネスチン免疫反応が腫瘍細胞中でのみ起こり、生成したネスチン量は、神経膠腫のグレードがより悪性つまり神経膠芽細胞腫になるほど、増加する。神経膠芽細胞腫（グレードIV）は、ネスチン陽性細胞中で最も高い発生率と一般的に最も高いレベルのネスチン染色を発現するネスチン発現は、神経外胚葉が発生部位である様々なタイプの原発性CNS腫瘍細胞で検出されるが、転移癌細胞では検出されない。ネスチンは拡散性星状膠細胞種ではほとんど発現されず、未分化星状膠細胞種では様々に発現され、神経膠芽細胞腫では強く不規則に発言され、その分布はGFAPやビメンチンを伴う補体経路で様々に変化する（Schiffer et al., 2006）。臨床的には、ネスチン陰性 CNS 生殖細胞腫瘍は播種しなかったが、一方、播種したすべての腫瘍もネスチンタンパク質を強く発現した（Sakurada et al., 2007）。

【０１４６】

ネスチンを強く発現する腫瘍細胞は、血管近くに局在することが多く（Dahlstrand et al., 1992）、（Kurihara et al., 2000; Sugawara et al., 2002; Florenes et al.,1994; Strojnik et al., 2007）、また、活性化された内皮細胞によるネスチン発現が血管形成マーカーとして示唆された（Teranishiet al., 2007; Maderna et al., 2007; Amoh et al., 2005; Mokry et al., 2004）。

【０１４７】

GBMは、腫瘍世代の能力など、幹細胞から予想される機能特徴の完全な補体を有する、形質転換された前駆体からなる。これらの細胞は、連続移植上でもGBMを確立し、それ故腫瘍神経幹細胞として同定できる（Galli et al., 2004）。これらの細胞はヒト脳腫瘍由来のCD133+細胞サブ集団に属しており、NSCマーカーネスチンを共発現するが、神経系統のマーカーは分化しない（Singh et al., 2004b; Singh et al., 2003; Singh et al., 2004a; Mao et al., 2007）。脳腫瘍のCD133+/ネスチン+ 集団の存在は、正常神経幹細胞が神経膠腫の起源細胞である可能性を示唆している（Shiras et al., 2007）。Ｎｏｔｃｈシグナリングは脳腫瘍と幹細胞で活性なので、ネスチンプロモーターがＮｏｔｃｈの作用により培養で活性化されることが示された（Shihand Holland, 2006）。

【０１４８】

ラット星状膠細胞腫C6 細胞株をネスチン siRNA 二本鎖で形質移入することにより、培養星状膠細胞腫細胞の成長に対するネスチンsiRNA の用量依存による効果的な抑制作用が明らかとなった（Wei et al., 2008）。

【０１４９】

ネスチン発現は前立腺癌と膵臓癌（Gu et al., 2007;Gipp et al., 2007）、メラノーマ（Carriere et al., 2007）の癌幹細胞についても報告されている。さらに、ネスチンはGIST（Tsujimuraet al., 2001; Sarlomo-Rikala et al., 2002)、メラノーマ（Florenes et al., 1994;Brychtova et al., 2007)、大腸癌（Teranishi et al., 2007）および膵臓腫瘍（Ohike et al., 2007;Kleeberger et al., 2007）中でも発現される。

【０１５０】

ネスチン発現は様々な正常組織中でも見出される。つまり、ネスチン発現は正常成熟ヒト腎糸球体の有足細胞でも報告されている。正常な状態で、ネスチンは発生初期段階で数種のタイプの糸球体細胞で発現され、成熟糸球体の有足細胞に閉じこめられ（Ishizaki et al., 2006）、これは、有足細胞機能の一部の性状に不可欠であることを示している。成人糸球体は有足細胞形態を伴うビメンチン発現細胞中でネスチン免疫反応性を示す（Bertelli et al., 2007）。ネスチンがビメンチンと相互作用して、糸球体濾過中に高い引張応力を経験する、有足細胞の構造的強度を強める可能性がある（Perry et al., 2007）。よって、ヒト腎臓でネスチンは、有足細胞、メサンジウム細胞、および内皮細胞内で糸球体発生の第１段階から発現される。この発現は続いて、成熟糸球体の有足細胞に限定され、ヒト成人腎臓の他の部分では検出されない（Su et al., 2007）。免疫組織化学法により、健常人の副腎皮質中では一定のネスチン発現が起こることが明らかになった。ネスチン発現細胞は、網状層に広く存在しているが、一方で副腎癌では色々な数のネスチン免疫反応細胞が示されている（Toti et al., 2005）。

【０１５１】

ネスチン発現は、正常消化器官のカハール間質細胞（ICC）で報告されている。よって、空洞中の殆どの筋肉内ICCおよび小腸のすべての腸管筋ICCは、大腸の一部の腸管筋 ICCと大腸輪走筋組織の殆どのICCと同様に、ネスチン免疫反応性である（Vanderwinden et al., 2002）。膵臓では、ネスチン免疫反応性細胞は膵島と外分泌部で見出される。大きい膵管領域で、ネスチン陽性細胞は、管表皮を取り囲む結合組織中に散らばっている末梢血管を代表している。よって、ネスチンはヒト膵臓で血管内皮細胞によって発現される（Klein et al., 2003）。膵島自身の中で、ネスチンを発現する膵島前駆体細胞が認められる。これらのネスチン陽性の膵島由来前駆体細胞は、膵島内に存在し、膵島分泌細胞の新生に関与する、他とは異なる細胞集団であると、仮定されている（Zulewski et al., 2001）。健常成人の肝臓で、ビメチンとネスチンに陽性なヒト肝臓幹細胞集団が単離可能であ

る（Herrera et al., 2006）。細胞培養アッセイで、免疫染色により細胞骨格と基質成分の分析した結果、胎児肺と成人骨髄に由来する細胞が中間フィラメント中で、ビメチンとネスチンタンパク質を発現することが、明らかとなった（Sabatini et al., 2005）。若い永久歯の機能的像牙芽細胞中でネスチンが認められる。その発現はダウンレギュレートされ、ネスチンは古い永久歯には存在しないが、一方、発現は虫歯や外傷歯には再びアップレギュレートされる（About et al., 2000）。

【０１５２】

ネスチン発現成人幹細胞は、成熟前下垂体の管腔領域でも認められ、遺伝子誘導原基分布図により、これらの管細胞が、下垂体の最終的に分化した6種の内分泌細胞タイプすべてのサブセットを発生するのに、役割を有していることが明らかとなった。これらの幹細胞は、器官形成に重要な役割を果たしていない一方、出産後拡大し、分化された子孫の生成を開始する。これにより、最初から完全に胚前駆体由来の分化細胞からなる器官のコロニーを形成する（Gleiberman et al., 2008）。

【０１５３】

核受容体サブファミリー2、グループE、メンバー1（NR2E1）

NR2E1（TLX）は、神経幹細胞の増殖および、転写抑制のためその下流標的遺伝子にヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）を集めることによる自己再生には、必須な転写因子であり、これにより順番に神経幹細胞の増殖を調節する。HDACの収集により、TLX標的遺伝子、サイクリン依存キナーゼ阻害剤であるp21(CIP1/WAF1)(p21)、および腫瘍抑制因子遺伝子であるPTENの転写抑制が起こる（Sun et al., 2007）。 分岐ホメオボックス遺伝子のTLX/HOX11 サブファミリーが、胚発生の色々な局面で関与しており、TLX1/HOX11 やTLX3/HOX11 L2の例では、ヒトT細胞急性リンパ芽球性白血病の癌遺伝子として顕著に機能する（Dixon et al., 2007）。NR2E1は、網膜措置期の基本的な発生プログラムの基礎をなし、適切な数の網膜子孫の形成と、長期間の網膜発生中のグリア細胞の発生を制御する（Miyawaki et al., 2004）。神経膠芽細胞腫に特異な情報は見出されていない。

【０１５４】

神経細胞接着分子（NRCAM）

ヒトNRCAM（細胞接着分子に関連する神経膠）は、神経膠芽細胞腫多形組織（GMT）では正常脳組織（NBT）に比べ過剰発現される。NRCAMは、アンキリンと相互作用する1回貫通型膜タンパク質として説明されている。アンチセンス hNRCAM は天然型 hNRCAM 発現の減少、細胞形態学上の変化、細胞増殖速度の減少、および細胞サイクルの延長を引き起こした。さらにこれらの細胞中でのアンチセンスhNRCAM の過剰発現により、軟寒天コロニー数およびin vitro過剰細胞基質（ECM）ゲルを通じた浸潤をかなり軽減させた。アンチセンス hNRCAMの過剰発現神経膠芽細胞腫細胞をヌードマウスへ皮下注射すると、形質転換細胞のみを指示する場合に比較して、腫瘍形成が完全に阻害された。アンチセンスhNRCAM 発現プラスミドの腫瘍内接種もin vivoヌードマウスで腫瘍成長の遅延を引き起こした（Sehgal et al., 1999)。遺伝子特異的RT-PCR 解析は、hNRCAMが正常脳組織に比べ、高グレードの星状膠細胞腫、神経膠腫および神経膠芽細胞腫の腫瘍組織では過剰発現されることを示した（Sehgal et al., 199）。神経細胞の増殖や案内でその機能が既知である、免疫グロブイン様細胞接着分子ファミリーの細胞－細胞接着分子、NRCAMは、ヒトメラノーマと大腸癌細胞の組織中でβカテニンシグナリングの標的遺伝子として、最近同定された。NRCAMのレトロウイルスで仲介された線維芽細胞への形質移入は、細胞運動性と腫瘍形成を誘導する（Conacci-Sorrell et al., 2005）βカテニンまたはプラコグロビンによるNRCAM転写の誘導は、おそらく、細胞成長と運動性を促進することでメラノーマと大腸癌の腫瘍形成に役割を果たしている（Conacci-Sorrell et al., 2002）。βカテニンシグナリングでの他の標的もMYC（Liu et al., 2008）のように、アップレギュレートされるNrCAM は、ヒト甲状腺乳頭癌で腫瘍病期に関係なく、mRNAとタンパク質レベルで過剰発現される（Gorka et al., 2007）。

【０１５５】

腫瘍内での NRCAM mRNAの過剰発現は、高い増殖指数に関連しており、上衣細胞腫の悪い

結果に関連していた（Zangen et al., 2007）。

【０１５６】

ポドプラニン（PDPN）

PDPNは、ヒト組織中の多様に分布するムチン様タイプI内在性膜糖タンパク質である。癌細胞の移動、浸潤、転移、および増悪に関与しており、血小板凝集に関与している。CLEC-2は最初に同定されたポドプラニン病態生理学受容体である（Kato et al., 2008）。115 件の神経膠芽細胞腫が抗PDPN抗体で免疫組織化学的に検討された。神経膠芽細胞腫の47%が表面細胞上で特に特に壊死領域で、内皮細胞を増殖しながら PDPN を発現した。さらに、PDPN mRNA とタンパク質の発現が、未分化の星状膠細胞腫よりも神経膠芽細胞腫でより顕著に高かく、これはPDPN発現が星状細胞のグレードに関連している可能性があるかもしれないことを示唆している（Mishima et al., 2006）。別の解析では、PDPN は 82.9% の神経膠芽細胞腫（29/35）で発現されることが示された（Shibahara et al.,2006）。PDPN発現と神経膠芽細胞腫細胞株の血小板凝集活性を検討する研究では、LN319 がPDPNを高く発現し血小板凝集を誘導した。高い反応性の抗PDPN抗体であるNZ-1は、LN319 による血小板凝集を中和し、誘導された血小板凝集の主な原因が PDPNであることを示唆した（Kato et al., 2006）。PDPN遺伝子発現レベルは、非癌性白質よりも神経膠芽細胞腫のほうが有意に高く、これは免疫組織化学的に確認された（Scrideli et al., 2008）。PDPNは、リンパ管で特異的に発現されるが、培養および腫瘍関連リンパ管形成における血管内皮細胞では発現されない。PDPN は健常人の上皮細胞に主として存在しないが、その発現は、28個中の22の扁平上皮癌細胞で強く誘導され、腫瘍増悪でのPDPNの役割を示唆している（PDPN ）。PDPN は多数のヒト癌細胞の浸潤前方にアプレギュレートされる。培養ヒト乳癌細胞、マウスの膵臓β細胞癌形成モデル、およびヒトの癌生検でのPDPN発現を検討した結果、PDPN はin vitro と in vivoで腫瘍細胞浸潤を促進させることが示された。PDPN は、小Rho ファミリー GTPアーゼ活性のダウンレギュレーションを通じて、糸状仮足形成による集団細胞移動を誘導する。結論として、PDPNは、上皮－間葉細胞転移なしで腫瘍細胞浸潤の別の経路を誘導し（Wicki et al., 2006）、PDPN 発現レベルは殆どの大腸直腸腫瘍患者で上昇し（Wicki et al., 2006）、TGFβは腫瘍細胞中のPDPN の生理学的調節因子であると考えられ（Suzuki et al., 2008）、PDPNは食道、肺、肝臓、大腸、および乳房由来、さらにリンパ節内皮細胞由来の癌細胞により発現される（Kono et al., 2007）。

【０１５７】

テナネインC（ヘキサブラチオン）（TNC）

正常脳ではなく神経膠芽細胞腫中の細胞外基質糖タンパク質 TNC の発現および、その発現と神経膠芽細胞腫増殖性内皮細胞基底膜との関連から、TNCが神経膠腫の有用なマーカーであることが1983年にすでに示唆されていた。腫瘍進行中に、腫瘍組織のECMは再形成され、その時点で腫瘍進行がより伝導される環境を提供する。その中で血管形成は不可欠なステップである（Carnemollaet al., 1999）。TNCは増殖指数が高い腫瘍血管で過剰発現されるが、増殖指数はTNCが腫瘍の血管形成に関係していることを示している（Kim et al., 2000）。腫瘍内で、TNC発現は低酸素状態により誘導される（Lal et al., 2001）。TNCの誘導は、TGFβ1によって仲介され、グレードの高い神経膠腫の健常な脳実質への浸潤メカニズムを提供している（Hau et al., 2006）。TNC 過剰発現も、ヒト神経膠芽細胞腫細胞の移動を有意に変化させることが知られているガストリンによる、テネイシンC遺伝子プロモーターの特異的活性化の結果である（Kucharczak et al., 2001）。TNCはトロポミオシン－1をダウンレギュレートするため、アクチンストレス線維を不安定化する。更に、TNCはWnt阻害因子Dickkopf1をダウンレギュレートさせる。トロポミオシン－1の発現低下とWntシグナル伝達の亢進は形質転換および腫瘍形成と密接な関連性があるため、TNCはこれらのシグナル伝達経路を特異的に調節し、神経膠腫細胞の増殖を増進する(Ruiz et al., 2004)。

【０１５８】

腫瘍に供給する血管周囲のTNCによる血管周囲染色は神経膠芽細胞腫組織で観察されるが、WHOのgradeIIおよびIII神経膠腫で観察されることは少ないことから、TNC染色の強度

は腫瘍のグレードと関連性があり、最も強く染色された場合は予後が悪いことを示している(Herold-Mende et al., 2002; Zukiel et al., 2006)。最も高いTNC発現は、腫瘍周辺の結合組織で観察される（Chiquet-Ehrismannand Tucker, 2004）。TNCは脳室下帯（SVZ）の幹細胞ニッチの生成にも寄与し、成長因子のシグナル伝達を統合し、神経幹細胞の発達を促進させるように作用する。TNCは、神経幹細胞中の EGFRの適時発現に不可欠であり、FGF2 シグナリングを強める。SVZにおける細胞に対するTNCの主な作用は、発達過程の制御である(Garcion et al., 2004)。TNCは、定方向へのヒト神経幹細胞（NSC）遊走の強力な誘導因子である（走触性）。そのため、腫瘍によって誘導されるECMは、播種性腫瘍細胞へのNSCの向性を許容する環境を作る(Ziu et al., 2006)。

【０１５９】

TNC 経路もほ乳類の腫瘍成長と転移に重要な役割を果たしている。そのため、MDA-MB-435 細胞中の TNC のシグナル遮断またはノックダウンの結果、細胞移動と足場非依存性の細胞増殖が明らかに低下する。TNC 発現が低下したクロナールMDA-MB-435 細胞を注射したマウスは、原発性腫瘍成長の有意な軽減、原発性腫瘍を切除後の腫瘍再発の減少、肺転移発生の減少を示した（Calvo et al., 2008）。

【０１６０】

サービビン（BIRC5）

アポトーシスタンパク質阻害剤（IAP）メンバーである、BIRC5（サービビン）の発現は、成人の正常分化組織で、特に増殖指数が低い場合は非常に低下すると共に、致死的組織と様々なヒトの癌組織内では上昇する。サービビンは、細胞増殖とアポトーシス細胞死の両方の調節が可能であると思われる。サービビンは通常細胞質領域に存在し、癌の予後の悪化に関与しているが、核転座つまり良好な予後の指標であるとも報告されている（O'Driscoll et al., 2003）。サービビン自身とそれを介する調節はいくつかのメカニズムによって説明されている。サービビンは分子シャペロンHsp60に関与しているようにみえる。Invivoで、Hsp60は、対応する正常組織に比べと、ヒト原発性腫瘍内に多量に発現される。小さい妨害RNAによるHsp60の急性除去は、サービビンのミトコンドリアプールを不安定化させ、ミトコンドリアの機能障害を誘導させ、カスパーゼ依存アポトーシスを活性化させる（Ghosh et al., 2008）。さらに、Rasの阻害によって、アポトーシス上でのサービビンの「ブレーキ」は放され、ミトコンドリアアポトーシス経路が活性化される。特に、神経膠芽細胞腫では、アポトーシスへの抵抗はサービビンを標的とするＲａｓ阻害剤によって無効となる（Blum et al., 2006）。神経膠腫内のNF-kappaB過剰活性とNF-kappaB標的遺伝子の1つであるサービビンの過剰発現との間に相関があるようにもみえる。そのため、NF-kappaB活性抗アポトーシス遺伝子は腫瘍試料中で過剰発現される。特に、神経膠芽細胞腫中では非常に高いレベルのサービビン発現が検出される。脳神経膠腫の生存過剰発現は、悪性増殖、抗アポトーシスおよび血管形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。サービビン発現と神経膠芽腫内での生存への影響を試験するために、いくつかの分析が実施された。

要するに、サービビン発現、特に星状細胞腫瘍内の核と細胞質での同時発現は、サービビン陰性腫瘍患者に比べて、悪性グレード（神経膠芽腫でのサービビン発現が最も高い）および生存期間の短縮に有意に関与していた（Kajiwara et al., 2003; Saito et al., 2007; Uematsu et al., 2005; Mellai et al., 2008;Grunda et al., 2006; Xie et al., 2006; Sasaki et al., 2002; Chakravarti et al.,2002）。

【０１６１】

サービビン過剰発現は他の腫瘍の存在に対しても説明されている。乳癌ではサービビン発現は高いグレードと無病生存期間の短縮に関与している（Yamashita et al., 2007; Al-Joudi et al., 2007; Span et al., 2004）。食道癌の細胞株でサービビンのプロモーター活性は正常組織の28.5倍高いことが示されている（Sato et al., 2006）。

大腸癌では、サービビン発現は病理学的グレードとリンパ節転移にも関与している（Tan et al., 2005）腎明細胞癌の進行度はサービビン発現が関与していることが示されている。さらに、サービビン発現は癌に限った生存率と逆相関している（Kosari et al., 2005

）サービビン発現はケラチノサイト腫瘍と過剰増殖皮膚病変のパネルで検出できるが、正常の皮膚では検出されない（Bowen et al.,2004）。膵臓癌の細胞株では、サービビンは試験した細胞株の58%で増幅された（Mahlamaki et al., 2002）。扁平上皮細胞癌では、サービビン発現はより高悪性で浸潤性の高い臨床表現型を伴う症例を同定するのに役立てることができる（Lo et al., 2001）。

【０１６２】

サービビンは癌療法で期待できる標的であり、サービビン由来ペプチドを用いた研究では、サービビンはCD8+T細胞介在応答を引き出すことにより癌患者で免疫原性であることを示している。

さらに、サービビンは同一患者の末梢血リンパ球でCD4+T細胞の反応性を特異的に刺激した（Casati et al., 2003; Piesche et al., 2007）。

【０１６３】

サービビン（SVN,BIRC）は癌が多数存在しても過剰発現される。そのため、サービビンの過剰発現は全生存率が短く悪性グレードが高いことに、関与していると考えられている。

【０１６４】

本発明はさらに、神経膠芽細胞腫の予後に使用できる特定なマーカータンパク質に関する。さらに、本発明は、癌治療用のこれらの新規標的の使用に関する。

【０１６５】

本明細書で提示しているように、タンパク質GFAP、FABP7、DTNA、NR2E1、SLCO1C1、CHI3L1、ACSBG1、IGF2BP3、NLGN4X、MLC1、NRCAM、BCAN、EGFR、PDPN、NES、およびCLIP2 は、正常脳や他の主要組織に比べ、神経膠芽細胞腫で高く発現される。タンパク質、GRP56、CSPG4、NRCAM、TNC、 BIRC5、CLIP2、NES、PDPN、EGFR、BCAN、GRIA4は、悪性形質転換、細胞成長、増殖、血管形成、または正常組織への浸潤に関与していることから、悪性腫瘍形成で重要な役割を有することが示されている。

【０１６６】

タンパク質NES、TNC、BIRC5、EGFR は、癌の幹細胞または神経膠芽細胞腫の幹細胞ニッチに関連している。癌幹細胞は、腫瘍成長の維持に必要な自己再生の可能性を持つ、腫瘍細胞のサブ集団である。これらの細胞は、癌幹細胞の自己再生の可能性を維持するのに必要である、いわゆる癌幹細胞ニッチと呼ばれる、特殊な非常に組織化された構造に存在している。腫瘍中のタンパク質BIRC5、NRCAM、IGF2BP3の過剰発現は、病期進行と患者予後の不良と関連していることが示されている。

【０１６７】

BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM およびPDPNは、神経系の腫瘍成長に必要な組織リモデリングで重要な役割を果たしていることが示されている。それ故、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNは、神経膠芽細胞腫を他の癌タイプと識別するマーカーとして使用できる。

【０１６８】

よって、本発明は、神経膠芽細胞腫を有する傾向のある動物、好ましくはヒトでの同定方法を提供する。1つの実施形態では、その測定の見込みは80%～100%である。該方法の1つは、動物被験者の腫瘍試料中でタンパク質BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNの1つ以上のレベルを定量することである。1つの実施形態では、試料は根治手術から得られる。1つの実施形態では、試料は針生検から得られる。

【０１６９】

測定時にBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNのレベルが同じ標本の良性上皮細胞中の測定値に対し、20 % 以上アップレギュレートされている場合、動物被験者は神経膠芽細胞腫を有する可能性が確認される。

【０１７０】

BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM およびPDPNからなる群でアップレギュレートされるタンパク質が異なれば異なるほど、動物被験者で神経膠芽細胞腫の傾向があると同定される可能性が高くなる。

【０１７１】
1つの実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNの測定はin situで実施される。別の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNの測定はin vitroで実施される。さらに別の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNの測定はin vivoで実施される。好ましい実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNの測定はウェスタンブロットと併用したレーザー捕獲顕微鏡で実施される。
【０１７２】
特定の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNの測定は、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNに特異な抗体で実施される。別の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNのレベル測定は、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNをコードする mRNA に特異なプライマーを使ったPCR で実施される。さらに別の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNのレベル測定は、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNをコードする mRNA に特異なヌクレオチドプローブで実施される。1つの実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNのレベル測定はノザンブロットにより実施される。別の実施形態では、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM またはPDPNのレベル測定はリボヌクレアーゼ保護アッセイにより達成される。他の実施形態では、酵素にリンクする免疫吸着剤分析（ELISA）、放射免疫アッサイ（RIA）、およびウェスタンブロットなどの免疫検査を、体液試料（血液、血清、痰、尿、または腹水）中のBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNのポリペプチドの検出に使用してもよい。生検、組織試料、および細胞試料（卵巣、リンパ節、卵巣表面表皮細胞剥離物、肺生検、管生検、および腹水、痰、胸水などの細胞を含む体液試料）は、組織または細胞試料を成分に分ける、および／または溶解させ、それをELISA、RIA、またはウェスタンブロットなどのポリペプチド検出用免疫アッセイで試験してもよい。該細胞または組織試料は、核酸に基づく方法、例、逆転写ポリメラーゼ鎖反応（RT-PCR）増幅、ノザンハイブリダイゼーション、またはスロット/ドットブロットによって分析されてもよい。組織試料内の腫瘍細胞の分布を視覚化するには、試料の組織構造を保存する診断検査、例、免疫組織染色、in situ RNA ハイブリダイゼーション、またはin situ RT-PCR などを使用して、神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドまたはmRNAを検出してもよい。腫瘤in vivo 局在を検査するには、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM および PDPNのポリペプチドと特異的に結合する抗体を被験者に導入して、核磁気共鳴イメージ（MRI）などの画像検査を使用してもよい。そこで抗体は共役するか、そうでない場合は常磁性体トレーサー（または、使用するイメージ方法に依存する、適切な検出可能な部分）と結合する。代わりに、抗体特異的な非ラベル化腫瘍マーカーの位置を、検出可能な部分と結合した二次抗体によって検出してもよい。
【０１７３】
さらに、本発明は、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび／または PDPN ポリペプチドからなるキメラ/融合タンパク質/ペプチド、および機能的で、タンパク質分解する、抗原フラグメントを含むそれらのフラグメントを提供する。
【０１７４】
ハイブリッド分子の融合パートナーまたはセクションは、$CD4^+$T細胞を刺激するエピトープを適切に提供する。$CD4^+$ 刺激エピトープは、該分野でよく知られており、破傷風トキソイドで確認されたものを含む。さらに好ましい実施形態では、ペプチドは融合タンパク質であり、特にHLA-DR 抗原関連変異体鎖（Ii）のN-末端アミノ酸からなる。1つの実施形態では、本発明のペプチドは、欠失型ヒトタンパク質またはタンパク質フラグメントの融合タンパク質であり、ヒトの一部に1つ以上の発明アミノ酸配列を含むならば、別のポリペプチドの一部である。
【０１７５】
BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM またはPDPN ポリペプチドへの抗体、BCA、C

LIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPN ポリペプチドからなるキメラ/融合タンパク質への抗体、たんぱく分解および抗原フラグメントなどのBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNポリペプチドのフラグメントへの抗体、およびこれらのフラグメントからなるキメラ/融合タンパク質/ペプチドへの抗体も、本発明の一部である。さらに、癌特に、神経膠芽細胞腫の予後に該抗体を使用する方法も本発明の一部である。

【０１７６】

本発明の抗体は、ポリクロナール抗体、モノクローナル抗体、および／またはキメラ抗体であってもよい。本発明のモノクローナル抗体を生成する不死化細胞株も本発明の一部である。

【０１７７】

当業者は、一部の事例では、腫瘍マーカー遺伝子としてBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNのより高い発現は、神経膠芽細胞腫被験者の予後不良を示すことを理解することになる。例えば、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNの比較的高いレベルの発現は、相対的に大きい原発性腫瘍、より高い腫瘍負荷（例、より広い転移）または比較的グレードの高い腫瘍の発現型を示す可能性がある。

【０１７８】

BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM およびPDPNからなる群の異なるタンパク質の過剰発現が多ければ多いほど、患者の予後は不良となる。

【０１７９】

本発明の診断と予後方法には、例えば、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNのポリペプチド検出用の抗体に基づく方法、およびBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM および／または PDPNのmRNA検出用の核酸ハイブリダイゼーションおよび／または増幅に基づく方法など、既知の方法が含まれている。

【０１８０】

さらに、急速な腫瘍細胞の破壊により自己抗体形成が起こることが多いので、神経膠芽細胞腫に対する本発明の腫瘍マーカーを、血清学的アッセイ（例、被験者血清のELISA 検査）に使用して、被験者のBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNに対する自己抗体を検出する可能性もある。BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNポリペプチド特異的自己抗体レベルがコントロール試料よりも約3倍以上（好ましくは、少なくとも5倍あるいは7倍以上、最も好ましくは、少なくとも10倍または20倍以上）の場合は、神経膠芽細胞腫を示している。

【０１８１】

細胞表面に局在する、細胞内の、分泌されたBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM および PDPN ポリペプチドはすべて、組織または細胞試料など（腹腔液のような液体試料から得た細胞も含め）の生検分析に使用し、組織または細胞生検を神経膠芽細胞腫細胞含有するものとして同定してもよい。生検はそのままの組織としてあるいは全細胞試料として分析してもよく、またはその組織と試料は使用する診断検査の特定なタイプの必要性に応じて、成分に分けるかおよび／または溶解させてよい。例えば、生検または試料は、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPN ポリペプチドまたはmRNAの in situ レベルの全組織または全細胞分析、例えば、免疫組織化学、in situ mRNA ハイブリダイゼーション、またはin situ RT-PCRの対象としてもよい。ELISA、免疫ブロット、またはそれに相当する方法など免疫学的方法を使ってポリペプチドまたは mRNA を解析するために、またはRT-PCR、ノザンハイブリダイゼーション、またはストット/ドットブロットなど核酸に基づく分析方法によりmRNA レベルを分析するために、どうやって組織や細胞を処理するかを当業者は知っている。

【０１８２】

BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM およびPDPNの発現レベル測定キット

本発明は、被験者の神経膠芽細胞腫マーカー遺伝子として、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPN の発現レベルの増大を検出するキットを提供する。神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドの検出用キットは、好ましくは特異的に選択される神経膠芽

細胞腫マーカーポリペプチド抗体を含む。神経膠芽細胞腫マーカーmRNAの検出用キットは、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM および PDPNの mRNAで特異的にハイブリッドする1つ以上の核酸（例、1つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーまたはプローブ、DNAプローブ、RNAプローブ、またはRNAプローブ形成用テンプレート）を含んでいる。

【０１８３】

特に、抗体に基づくキットは、抗体またはその免疫反応性フラグメントを特異的に結合する、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNポリペプチドの存在の検出および／またはそれらのペプチドレベルの測定に使用できる。キットには、抗原と反応する抗体および抗原抗体反応を検出する試薬を含む。該キットはELISAキットでよく、適宜コントロール（例、特定神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドの指定量）、一次および二次抗体を、また検出可能な部分、酵素基質および着色試薬など上述したような他の必要な試薬すべてを含む。診断用キットは代わりに、一般的に本明細書で記述した成分や試薬からなる免疫ブロットキットであってもよい。

【０１８４】

組織または細胞生検などの試料中のBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNの mRNAの検出および／またはそれらのmRNA量を測定することにより、核酸に基づくキットは、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNの検出および／またはそれらの発現レベルの測定に使用できる。例えば、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM およびPDPN発現の上昇を検出するための RT-PCR キットは、好ましくは、 神経膠芽細胞腫マーカー mRNA の cDNAへの逆転写と神経膠芽細胞腫マーカーcDNAのPCR増幅の実施に十分なオイゴヌクレオチドプリマーを含み、また好ましくは、適切な陰性および陽性コントロールと量子化用の内部コントロールを実行するための、コントロールPCRテンプレート分子とプライマーも含む。当業者は、逆転写と PCR 反応を実行するための適切なプライマーと、実行する適切なコントロール反応を選択する方法を理解するであろう。該手引きは、例えば、F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley &Sons, New York, N.Y., 1997に見出される。 RT-PCR の多数のばらつきは当該分野で知られている。免疫毒素ンのBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNへの標的送達は、神経膠芽細胞腫の治療または予防のための治療標的として使用できる。例えば、細胞表面に局在するBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNポリペプチドと特異的に結合する抗体分子は、ラジオアイソトープまたは他の毒性化合物と結合することができる。抗体結合体を被験者に投与すると、抗体は同族の神経膠芽細胞腫ポリペプチドと結合し、その結果、神経膠芽細胞腫細胞への治療化合物の標的送達が起こり、それにより卵巣癌が治療される。

【０１８５】

治療を担う部分はトキシン、ラジオアイロソープ、薬物、化学物質、またはタンパク質である（Bera et al."Pharmacokinetics and antitumor activity of a bivalentdisulfide-stabilized Fv immunotoxin with improved antigen binding toerbB2" Cancer Res.59:4018-4022 (1999)を参照）例えば、トキシンをBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNを発現する細胞に標的送達するために、抗体は、細菌性毒素（例、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素 A、コレラ毒素）または植物毒素（例、リシン毒素）に結合または接合できる。この免疫毒素は1つの細胞に送達され、細胞表面に局在する神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドと結合するとすぐに、神経膠芽細胞腫マーカー特異的抗体に接合する毒素がその細胞に送達されることになる。

【０１８６】

さらに本発明の別の態様は、HLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスＩあるいはＩＩに特異的に結合している抗体に関する（以後「複合体特異的抗体」と呼ぶ）。さらに、本発明の別な態様は続いて、HLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIあるいはIIに特異的に結合している前記抗体の生成方法に関する。その方法には、HLA制限抗原と複合体を形成している前記ヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスIあるいはIIの溶解型前記MHCを発現する細胞を含む

遺伝子組換え非ヒトほ乳類の免疫化方法、前記非ヒトほ乳類の細胞を生成する抗体からのmRNA分子の単離方法、前記mRNA分子によりコードされたタンパク質分子を表示するファージディスプレイライブラリーの生成方法、および前記ファージディスプレイライブラリーの１つ以上のファージ、つまりHLA制限抗原と複合体を形成しているヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスＩあるいはIIに特異的に結合している前記抗体を表示する１つ以上の前記ファージの単離方法が含まれる。該抗体と単鎖クラスＩ主要組織適合複合体の各生成方法と、これらの抗体の他の生成ツールは、WO03/068201、WO 2004/084798、WO 01/72768、WO 03/070752、およびCohen CJ,Denkberg G, Lev A, Epel M, Reiter Y. Recombinant antibodies with MHC-restricted, peptide-specific, T-cell receptor-like specificity:new tools tostudy antigen presentation and TCR-peptide-MHC interactions. J Mol Recognit.2003 Sep-Oct;16(5):324-32.、Denkberg G, Lev A, Eisenbach L, Benhar I, Reiter Y.Selective targeting of melanoma and APCs using a recombinant antibody withTCR-like specificity directed toward a melanoma differentiation antigen. JImmunol. 2003 Sep 1;171(5):2197-207、および Cohen CJ, Sarig O, Yamano Y, Tomaru U, Jacobson S, Reiter Y. Direct phenotypic analysis of human MHC class I antigenpresentation:visualization, quantitation, and in situ detection of human viralepitopes using peptide-specific, MHC-restricted human recombinant antibodies. JImmunol. 2003 Apr 15;170(8):4349-61に開示されており、これらは本発明の目的のため、その全体が参考文献として引用されている。

【０１８７】

抗体は、本発明の状況で「特異的」と見なされる複合体と20nM、好ましくは10nM未満の結合親和性で結合していることが好ましい。

【０１８８】

「抗体」という用語は、ここでは広い意味で使われており、ポリクロナールおよびモノクローナル抗体の両方を含む。「抗体」という用語には、完全免疫グロブリン分子に加え、これらの免疫グロブリン分子およびヒト型免疫グロブリン分子のフラグメントまたはポリマーも、本明細書で記載されている何らかの望ましい性質（例、上述の複合体特異的抗体である、増大したレベルで癌マーカーを発現する癌細胞にトキシンを送達する、および／またはサービビンなど、癌マーカーポリペプチド活性を阻害する）を表す限り含まれる

【０１８９】

さらに、特異的リガンド（例、細胞表面に局在するタンパク質に結合するリガンド）が存在する、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM、PDPNのいずれのポリペプチドに対しても、そのリガンドは、上述したように神経膠芽細胞腫細胞に対する毒性化合物を標的とするために、抗体の代わりに使用されうる。

【０１９０】

可能な限り、本発明の抗体は市販品を購入する。本発明の抗体はよく知られた方法でも生成してもよい。熟練した当業者は本発明の抗体生成に、癌マーカーの完全なポリペプチドまたはそのフラグメントのどちらを使用してもかまわない。本発明の抗体生成に使用されるポリペプチドは、天然物から部分的にあるいは完全に生成しても、あるいは組み換えＤＮＡ技法により生成してもよい。例えば、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM、PDPNのポリペプチドまたはそのフラグメントをコードするcDNAは、原核生物（例、細菌）または真核生物（例、酵母、昆虫、ほ乳類細胞）中で発現され、その後、組み換えタンパク質が精製され、抗体生成用神経膠芽細胞腫マーカーポリペプチドと特異的に結合するモノクローナルまたはポリクロナール抗体製剤を生成するのに使用される。

【０１９１】

モノクローナルまたはポリクロナール抗体の２つ以上の異なるセットを生成すると、目的とする用途（例、ELISA、免疫組織化学、in vivo画像、免疫毒素療法）に必要な特異性と親和性を有する抗体を得る可能性が最大となることを、当業者は知ることになる。使用される目的（例、ELISA、免疫組織化学、免疫療法など、抗体の生成と試験についての詳細な手引きの例として、Harlowand Lane, Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Sprin

g Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, N.Y., 1988を参照）に応じて、その抗体が望ましい活性を有しているか既知方法で試験される。例えば、抗体は、ELISAアッセイ、ウェスタンブロット、ホルマリン固定神経膠芽細胞腫試料または冷凍組織切片の免疫組織化学染色法で試験される。最初のin vitroキャラクタリゼーション後、治療または体内診断を使用目的とした抗体は、既知の臨床検査方法に従って試験される。

【０１９２】

本明細書で使われている「モノクローナル抗体」という用語は、十分均質な集団から得られる抗体を意味し、つまり集団に含まれる個々の抗体は少量で提示される自然発生変異の可能性以外は、同一である。本明細書のモノクローナル抗体は具体的にはキメラ抗体であり、その中の重鎖および／または軽鎖部分は、特定種由来の抗体あるいは抗体の特定クラスまたはサブクラスに属する抗体に対応する配列と同一かまたは相同であり、一方、望ましい拮抗作用を表す限り、鎖の残基は別種由来の抗体あるいは抗体の別のクラスまたはサブクラスに属する抗体、およびその抗体のフラグメントに対応する配列と同一または相同である（米国特許No.4,816,567）。

【０１９３】

本発明のモノクローナル抗体はハイブリドーマ法によって調製される。ハイブリドーマ法では、通常マウスまたは他の適切な宿主動物が免疫製剤で免疫化され、免疫製剤に特異的に結合する抗体を生成するか、生成能力有するリンパ球を誘導する。代わりに、リンパ球をin vitroで免疫化してもよい。

【０１９４】

モノクローナル抗体は米国特許No.4,816,567記載の方法など、組み換えDNA法によっても生成してもよい。

本発明のモノクルナール抗体をコードするDNAは、従来手順（例、マウス抗体の重鎖と軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力があるオリゴヌクレオチドプローブを用いる）によって容易に単離し配列決定されうる。

【０１９５】

In vitroの方法も一価の抗体調製には適している。フラグメント特に、Fabフラグメントを生成する抗体の消化は、当該分野で決まっている既知技術によって達成できる。例えば、消化はパパインによって達成可能である。パパイン消化の例は、1994年12月22発行WO 94/29348と米国特許No.4,342,566に記載されている。抗体のパパイン消化により、通常Fabフラグメントと呼ばれる同一抗原に結合している２つのフラグメント（各々が単一抗原結合部位と残留Feフラグメントを有する）が生成される。ペプシン処理により、2つの抗原が結合する部位をもち、しかも架橋結合抗原能力を有するフラグメントが得られる。

【０１９６】

他の配列に繋がっているか否かにかかわらず、抗体フラグメントは、その活性が非改変抗体または抗体フラグメントに比べて有意に変化あるいは減弱されていなければ、特定領域または特定アミノ酸残基の挿入、削除、置換、または他の選択的改変も含む。これらの改変は、ジスルフィド結合能力のあるアミノ酸の削除／追加、生物的寿命の延長、分泌特性の変更など、いくつかの別の特性を提供しうる。いずれの場合も、抗体フラブメントは、結合活性、結合ドメインにおける結合調節などの生物活性の特質を所有していなければならない。抗体の機能領域すなわち活性領域は、タンパク質の特定領域の変異原性、続いて発現と発現ポリペプチドの試験によって同定される。該方法は、当該分野の実施者には容易に明らかであり、抗体フラグメントをコードする核酸の部位特異的変異原性を含みうる。

【０１９７】

本発明の抗体は、さらにヒト化抗体またはヒト抗体を含む。非ヒト抗体（例、マウス）のヒト化型は、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラブメント（Fv, Fab, Fab’または抗体の他の抗原結合配列など）であり、それらは非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含んでいる。ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（受容抗体）を含み、その中で受容体の補体決定領域（CDR）からの残基は、マウス、ラット、ウサギなど望ま

しい特異性、親和性と容量を持つ非ヒト種（ドナー抗体）CDRからの残基によって置換される。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのＦｖフレームワーク（FR）残基が対応する非ヒト残基で置換される。ヒト化抗体はまた、受容抗体内でも、取り込まれたCDRまたはフレームワーク配列内のいずれでも検出されない残基も含む。ヒト化抗体は、1つの通常は2つの可変ドメインのすべてを十分に含み、その中で、CDR領域のすべて、またはその大半が非ヒト免疫グロブリンのものに対応しており、FRのすべて、またはその大半がヒト免疫グロブリンに一致する配列のものに対応している。ヒト化抗体は最適には、少なくとも免疫グロブリン一定領域（Fc）の一部を、通常はヒト免疫グロブリンの一部を含むことである。

【０１９８】

非ヒト抗体のヒト化方法は当該分野ではよく知られている。ヒト化抗体は非ヒト源から導入された1つ以上のアミノ酸残基を有している。これらの非ヒトアミノ酸残基は、頻繁に「取り込み」残基と呼ばれ、通常「取り込み」可変ドメインから取り込まれる。ヒト化は基本的には、げっ歯動物のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列に代用することで達成されうる。従って、該「ヒト化」抗体はキメラ抗体であり（米国特許No.4,816,567）、そこでは、完全ヒト可変ドメインよりもかなり少ないドメインが非ヒト種の対応する配列で置換される。実際には、ヒト化抗体は通常、一部のCDR残基および可能なら一部のFR残基が、げっ歯動物抗体のアナログ部位の残基で置換されたヒト抗体である。

【０１９９】

免疫化時点で、内在性免疫グロブリン産生なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生できる遺伝子組換え動物（例、マウス）を採用できる。例えば、キメラまたは生殖系列変異マウスで、領域遺伝子に加わる抗体重鎖のホモ接合体が欠損する結果、内在性抗体産生が完全に阻害される。そのような生殖系変異マウスにおいてヒト生殖系免疫グロブリンの遺伝子アレイが転移するとその結果、抗原刺激時にヒト抗体が産生される。ヒト抗体はファージディスプレイライブラリーでも生成されうる。

【０２００】

本発明の抗体は、好ましくは薬剤的に認容される担体に混ぜて被験者に投与される。通常、適切な量の薬剤学的に認容性のある塩が、製剤を等張状態にさせるために製剤中に使われる。薬剤学的に認容性のある担体例には生理食塩液、リンゲル溶液およびデキストロース溶液が含まれる。溶液のpHは、好ましくは５～８であり、さらに好ましくは約７～７．５である。さらに単体は抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスのような徐放性製剤を含み、そのマトリクスは成形品の剤型、例えばフィルム、リポソーム、または微粒子などである。特定の担体は、例えば、投与経路や投与される抗体濃度次第でさらに好ましくなることは、当業者には明確である。

【０２０１】

抗体は注射（静注、腹腔内注、皮下注、筋注）によって、または効果的な剤型で確実に血流に送達させる注入など他の方法によって、被験者、患者または細胞に投与されうる。抗体は、局所と全身治療効果を与えるために、腫瘍内または腫瘍周辺経路によっても投与可能である。局注または静注が好ましい。

【０２０２】

抗体の有効な用量と投与スケジュールは経験的に決定され、そのような決定は当該分野の技術範囲内である。当業者は、抗体の投与すべき用量が例えば、抗体を受け取る被験者、投与経路、使用抗体の特定タイプ、および他の投与薬などに依存して変化することを理解することになる（Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haber et al, eds. Raven Press, New York (1977)pp. 365-389.）。抗体単独使用での典型的な１日用量は、上述した要因に依存して、１日約１μg/kg体重 から100 mg/kg体重以上の範囲であるかもしれない。神経膠芽細胞腫の治療に抗体を投与後、治療用抗体の効能は熟練医師によく知られた様々な方法で評価されうる。例えば、その治療を受ける被験者の神経膠芽細胞腫のサイズ、数、および／または分布が標準的な腫瘍画像技法によってモニターされる。腫瘍の成長を止めるために投与する治療用抗体は、抗体の非投与時に起こる疾病経過に比べ、

腫瘍を縮小させ、および／または新たな腫瘍発現を防止し、神経膠芽細胞腫治療に有効な抗体である。

【０２０３】

本発明の神経膠芽細胞腫腫瘍マーカー、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNは神経膠芽細胞腫細胞で高く発現され、正常細胞では非常に低レベルで発現されるので、BCA、CLIP2、 DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたはPDPNの発現またはポリペプチド活性は、神経膠芽細胞腫の治療または予防としていずれの治療法にも統合される可能性がある。

【０２０４】

アンチセンス療法の原理は、遺伝子発現の配列に特異的な抑制（転写または翻訳による）は、ゲノムDNAまたはmRNAと補体アンチセンス種間の細胞内ハイブリダイゼーションによって達成される可能性があるという仮定に基づいている。該ハイブリッド核酸二本鎖の形成は、ゲノムDNAをコードする標的腫瘍抗原の転写または、標的腫瘍抗原mRNAのプロセッシング/運搬/翻訳および／または安定性を妨害する。

【０２０５】

アンチセンス核酸は、様々なアプローチによって供給される。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスRNA は、腫瘍細胞への取り込みを可能にさせる製剤で直接被験者に直接投与できる。あるいは、アンチセンスRNA(またはRNA フラグメント)をコードするウイルスまたはプラスミドベクターをin vivoで細胞に導入できる。アンチセンス効果は、センス配列によって導入することもできるが、表現型の変更程度は非常に様々である。効果的なアンチセンス療法によって誘導された表現型の変化は、例えば標的mRNA、標的タンパク質レベル、および/標的タンパク質活性レベルなどの変化にしたがって評価される。

【０２０６】

特異的な例では、アンチセンス遺伝子療法による神経膠芽細胞腫マーカー機能の阻害は、アンチセンス神経膠芽細胞腫マーカーRNAを直接被験者に投与することにより達成する可能性がある。アンチセンス腫瘍マーカーRNAは、いずれの標準方法によっても生成/単離される可能性があり、高効率のプロモーターの制御下でアンチセンス腫瘍マーカーcDNAを使用し、in vitro転写により最も簡単に生成される。アンチセンス腫瘍マーカーRNAの細胞への投与は、以下に述べる核酸の直接投与するいずれの方法によっても実施可能である。

【０２０７】

遺伝子療法によるBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび／またはPDPN機能を阻害する代わりの対策には、アンチBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNの細胞内発現、あるいはアンチBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAM、またはPDPN抗体の一部の細胞内発現を含む。例えば、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたは PDPNポリペプチドに特異的に結合し、その生物活性を阻害するモノクローナル抗体をコードする遺伝子（または遺伝子フラグメント）が、核酸発現ベクター内で特異的（例、組織または腫瘍特異的）遺伝子の調整配列の転写制御下におかれる。ベクターは続いて被験者に投与され、神経膠芽細胞腫細胞または他の細胞によって取り込まれる。それらの細胞はアンチBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMまたはPDPN抗体を分泌し、その結果、BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNポリペプチドの生物活性を遮断する。好ましくは、BCA, CLIP2, DTNA, NLGNAX, NR2E1, NRCAM and PDPNポリペプチドは、神経膠芽細胞腫細胞の細胞外表面にある。

【０２０８】

外因性DNAの被験者の細胞への投与と取り込みを含む上述の方法では（すなわち、遺伝子形質導入またはトランスフェクション）、本発明の核酸は裸のDNA型内にあるか、または、神経膠芽細胞腫マーカータンパク質の発現阻害用に、核酸を細胞に送達させるベクター内にあるかである。ベクターは、アデノウイルスベクター（QuantumBiotechnologies, Inc. (Laval, Quebec, Canada)）にような、市販で入手できる製剤である核酸またはベク

ターは多様な機序によって細胞に送達される。１例として、送達は、LIPOFECTIN、LIPOFECTAMINE（GIBCO-25 BRL, Inc., Gaithersburg, Md.）、SUPERFECT（Qiagen, Inc. Hilden, Germany）およびTRANSFECTAM（Promega Biotec, Inc., Madison, Wis.）などの、市販で入手できるリポソーム製剤や、当該分野で標準の手順にしたがって開発された他のリポソームを使って、リポソームを介して行える。

さらに、本発明の核酸またはベクターは、Genetronics, Inc.（SanDiego, Calif.）から購入可能な技法である電気穿孔法や、SONOPORATION マシン（ImaRx Pharmaceutical Corp.,Tucson, Ariz.）によって in vivoで送達されうる。

【０２０９】

一例として、ベクターは、組み換えレトロウイルスゲノムをパッケージ可能なレトロウイルスベクター系のような、ウイルス系によって送達可能である。組み換えレトロウイルスは続いて感染するために使われ、その結果、BCA、CLIP2、DTNA,NLGNAX、NR2E1、NRCAM または PDPNの発現を阻害する、感染細胞アンチセンス核酸に送達しうる。

改変核酸をほ乳類の細胞に導入する確実な方法は、もちろんレトロウイルスベクターの使用だけに限定されない。アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター、偽型レトロウイルスベクターなど、この手順に対して他の技法を広く利用できる。リポソーム送達、仲介受容体、および他のエンドサイトーシスなど、物理的な形質導入技法も使用できる。本発明は、これらのいずれかまたは他の一般的に使用される遺伝子転移方法と併用可能である。

【０２１０】

抗体はまた体内診断分析法としても使用できる。抗体は放射性ヌクレオチド（^{111}In、^{99}Tc、^{14}C、^{131}I、^{3}H、^{32}P または ^{35}S）で標識化され、免疫シンチグラフィーによって腫瘍の場所が突き止められる。１つの実施形態では、抗体またはそのフラグメントは2つ以上の癌標的細胞の細胞外マトリックスに結合し、その親和性値（Kd）は1x10μM未満である。

【０２１１】

診断用抗体は様々な画像法による検出に適したプローブで標識化される。プローブの検出方法には、蛍光、光、共焦点電子顕微鏡、磁気共鳴画像スペクトロスコピー、コンピューター断層撮影法（CT）、およびポジトロンCTなどが含まれるが、これだけに限定されない。適切なプローブには、フルオレセイン、ローダミン、エオシンおよび他の蛍光色素分子、放射性同位体、金、ガドリニウムおよび他のランタン系元素、常磁性鉄、フッ素－18、および他のポジトロン放出放射性核種が含まれるが、これだけに限定されない。さらに、プローブは2つあるいは複数機能を有し、上述した方法2つ以上で検出される。これらの抗体は前記プローブで直接または間接的に標識化される。抗体へのプローブの結合には、プローブの共有結合、抗体内へのプローブの取り込み、プローブ結合へのキレート化合物の共有結合を含み、当業者にはよく認められている。免疫組織化学では、疾病組織試料は新鮮か冷凍されるか、またはパラフィンで埋め込まれホルマリンのような保存剤で固定される。固定あるいは埋め込まれたセクションには、標識化された一次抗体と二次抗体と接触している試料が含まれ、ここで抗体はBCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPNタンパク質の発現をそのままの状態（in situ）またはin vitroで検出するのに使われる。

【０２１２】

そこで本発明では、別の好ましい一態様として、配列番号：１～３０の群または 配列番号：１～３０の配列と 85% 相同である変異体、または上記のペプチドとT細胞の交差反応を引き起こす変異体から選択された配列からなるペプチドを提供する。

好ましい実施形態では、ペプチドは、配列番号：１～２４の群または 配列番号：１～２４の配列と85%相同である変異体、または上記のペプチドとT細胞の交差反応を引き起こす変異体から選択された配列からなるペプチド群から選択される。

【０２１３】

本発明のペプチドは、ヒト主要組織適合複合体（MHC）クラスＩまたはＩＩ分子への結

合能力を有する。

【０２１４】

本発明において、「相同性」という用語は、2つのアミノ酸配列、すなわちペプチドまたはポリペプチド配列などの配列間の同一性の程度を示す。前述の「相同性」とは、至適条件で整列させた２つの配列を、比較される配列と比べることで決定される。ここでいう比較される配列は、２つの配列の最適アラインメントにおいて、追加、または欠失（例、ギャップなど）していてもよい。そのようは配列の相同性は、ClustalWアルゴリズムなどのアラインメントを作ることで計算できる(NucleicAcid Res., 22(22): 4673 4680 (1994))。一般的に入手可能な配列解析ソフトウェア、より具体的には Vector NTI、GENETYXすなわち解析ツールが公開データベースとして提供されている。

【０２１５】

当業者は、特定のペプチド変異体で誘導されたＴ細胞とペプチド自体との交差反応が可能かについて評価できることになる(Fong et al., 2001) (Zaremba et al., 1997; Colombetti et al., 2006; Appay etal., 2006).。

【０２１６】

発明者によれば、 特定のアミノ酸配列の「変異体」とは、側鎖、例えば１個または２個のアミノ酸残基が修正され、（例えば、このアミノ酸残基の側鎖を他の天然発生的なアミノ酸残基の側鎖または他の側鎖で置き換えることにより）その結果、このペプチドが置換後も、配列番号：１～３０における特定アミノ酸配列からなるペプチドと実質上同じようにHLA分子に結合できることを、意味するものである。

例えば、ペプチドは、HLA-A*02や-DRなどの適当なMHC分子の結合溝と相互作用したり、結合したりする能力を、改善しないまでも少なくとも維持するように改変され、そのようにして、ペプチドは活性化ＣＴＬのTCR との結合能力を改善しないまでも少なくとも維持する。これらのＣＴＬ は、実質上細胞と交差反応ができ、本発明の態様で定義されているように同族ペプチドの、天然のアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現している細胞を殺傷できる。科学文献(Rammensee et al., 1997)や、データベース (Rammensee et al., 1999)から得られるように、HLA 結合ペプチドの特定な位置は、HLA受容体の結合モチーフに結合できるコア配列を持つアンカー残基であり、一般的に結合溝を構成するポリペプチド鎖のイオン性、電気物理性、疎水性、空間性といった性質により特徴づけられる。こうして、当業者は、既存のアンカー残基を保持しながら配列番号：１～３０のアミノ酸配列を修飾できるようになり、また、そのような変異体のMHCクラスIまたはII分子への結合能力を保持するかについて決定できることになる。本発明の変異体は、活性化TCLへのTCRとの結合能力を維持しており、実質的に交差反応が可能であり、また、本発明の態様で定義しているように、同族ペプチドの体内アミノ酸配列を含んだポリペプチドを発現する細胞を殺傷できる。

【０２１７】

実質上Ｔ細胞受容体と相互作用できないこれらのアミノ酸残基は、Ｔ細胞受容体との結合が実質上Ｔ細胞活性に影響せず、また関連するMHCとの結合を壊さない、他のアミノ酸との置換によって修飾できる。こうして本発明のペプチドは、所定の条件とは別に、アミノ酸配列または、その一部分または変異体を含んだいずれかのペプチド（オリゴペプチドまたはポリペプチドを含む）である。

【０２１８】

表２：変異体と配列番号:1 ～25 に記載のペプチドの変異体とモチーフ

【表２】

		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CSP-001	ペプチドコード		T	M	L	A	R	L	A	S	A
配列番号 25	変異体										L
				L							L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K		Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ACS-001	ペプチドコード		K	I	M	E	R	I	Q	E	V
配列番号 3	変異体			M							L
				L							L
										K	
			I		A	G	I		A		
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
					P		N				
			M				F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BCA-001	ペプチドコード		F	L	G	D	P	P	E	K	L
配列番号 4	変異体			M							
						E					
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
					F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BCA-002	ペプチドコード		A	L	W	A	W	P	S	E	L
配列番号 5	変異体			M							
						E				K	
			I		A	G	I	I	A		
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				

			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CHI3L1-010	ペプチドコード		T	L	Y	G	M	L	N	T	L
配列番号6	変異体			M							
						E				K	
			I		A		I	I	A	E	
			L			P	K		Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CLIP2-001	ペプチドコード		S	L	N	E	L	R	V	L	L
配列番号7	変異体			M							
										K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
SLCO1C1-001	ペプチドコード		Y	L	I	A	G	I	I	S	L
配列番号2	変異体			M							
						E				K	
			I		A	G	I		A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
					S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
DTNA-001	ペプチドコード		K	L	Q	D	E	A	Y	Q	V
配列番号8	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L			
			F		F	T	Y	T	H		
					P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						

		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
EGFR-007	ペプチドコード		**A**	**L**	A	V	L	S	N	**Y**	**D**	A
配列番号９	変異体			M							L	
											L	
						E				K		
			I		A	G	I	I	A	E		
			L		Y	P	K	L	Y			
			F		F	T	Y	T	H			
			K		P		N					
			M		M		F					
			Y		S		V					
			V		R							

		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
FABP7-001	ペプチドコード		**L**	**T**	F	G	D	V	V	**A**	**V**
配列番号:１０	変異体			M							L
				L							L
						E				K	
			I		A		I	I	A	E	
					Y	P	K	L	Y		
			F			T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						

		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GFAP-001	ペプチドコード		**N**	**L**	A	**Q**	D	L	A	**T**	**V**
配列番号:１１	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I			G	I	I		E	
			L		Y	P	K		Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						

		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GPR56-002	ペプチドコード		**F**	**L**	L	S	E	P	V	**A**	**L**
配列番号:１２	変異体			M							
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
					F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				

			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
GRI-001	ペプチドコード		**N**	**I**	L	E	**Q**	I	V	**S**	**V**
配列番号:１３	変異体			M							L
				L							L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
IGF2BP3-001	ペプチドコード		**K**	**I**	**Q**	E	I	L	T	**Q**	**V**
配列番号:１４	変異体			M							L
				L							L
										K	
			I		A	G		I	A	E	
			L		Y	P	K		Y		
			F		F	T	Y	T	H		
					P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MLC-001	ペプチドコード		**S**	**V**	V	E	V	I	A	**G**	**I**
配列番号:１５	変異体			M							L
				L							L
										K	
			I		A	G	I			E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S						
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NES-001	ペプチドコード		**G**	**L**	**Q**	S	**Q**	I	A	**Q**	**V**
配列番号:１６	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I		A	G	I			E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				

			M		M		F							
			Y		S		V							
			V		R									
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
NES-002	ペプチドコード		S	L	Q	E	N	L	E	S	L			
配列番号:１７	変異体			M										
										K				
			I		A	G	I	I	A	E				
			L		Y	P	K		Y					
			F		F	T	Y	T	H					
			K		P									
			M		M		F							
			Y		S		V							
			V		R									
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NES-003	ペプチドコード		F	L	F	P	G	T	E	N	Q			
配列番号:１８	変異体			M							L			
											L			
						E				K				
			I		A	G	I	I	A	E				
			L		Y		K	L	Y					
						T	Y		H					
			K		P		N							
			M		M		F							
			Y		S		V							
			V		R									
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
NES-004	ペプチドコード		N	L	A	E	E	L	E	G	V			
配列番号:１９	変異体			M							L			
											L			
										K				
			I			G	I	I	A	E				
			L		Y	P	K		Y					
			F		F	T	Y	T	H					
			K		P		N							
			M		M		F							
			Y		S		V							
			V		R									
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
NLGN4X-001	ペプチドコード		N	L	D	T	L	M	T	Y	V			
配列番号:１	変異体			M							L			
											L			
						E				K				
			I		A	G	I	I	A	E				
			L		Y	P	K	L	Y					

			F		F		Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NR2E1-001	ペプチドコード		**K**	**I**	I	S	E	I	**Q**	**A**	**L**
配列番号20	変異体			M							
				L							
						E				K	
			I		A	G	I		A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
					P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
NRCAM-001	ペプチドコード		**G**	**L**	W	H	H	Q	T	**E**	**V**
配列番号21	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PDPN-001	ペプチドコード		**T**	**L**	V	G	I	I	V	**G**	**V**
配列番号22	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I		A				A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TNC-001	ペプチドコード		**A**	**M**	T	Q	L	L	A	**G**	**V**
配列番号23	変異体										L
				L							L
						E				K	

			I		A	G	I	I		E	
			L		Y	P	K		Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						
		位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TNC-002	ペプチドコード		**Q**	**L**	L	A	G	V	F	**L**	**A**
配列番号24	変異体			M							L
											L
						E				K	
			I		A	G	I	I	A	E	
			L		Y	P	K	L	Y		
			F		F	T	Y	T	H		
			K		P		N				
			M		M		F				
			Y		S		V				
			V		R						

【０２１９】

MHCクラスＩＩ提示ペプチドは、特定のHLA対立遺伝子の特異的モチーフに適合したアミノ酸配列を持つ「コア配列」と、任意選択として、Ｎ末端および／またはコア配列の機能を阻害しないＣ末端伸長アミノ酸配列（すなわちこのペプチド、および天然カンターパートを認識するＴ細胞クローンの全てあるいはサブセットとの相互作用とは無関係とみなされる）から構成されることはよく知られている。N末端および／またはC末端の伸長は、それぞれ例えば、1～10アミノ酸長である。これらのペプチドは直接使用され、MHCクラスII分子に負荷でき、また以下に示す方法で、この配列がベクターにクローン化できる。これらのペプチドは、細胞内で、より大きなペプチドが加工された最終産物であるため、より長いペプチドも、同様に利用できる。本発明のペプチドは、いずれのサイズでもよいが、一般的には分子量は100,000未満、好ましくは50,000未満、より好ましくは10,000未満であり、また通常は約5,000である。

本発明のペプチドのアミノ酸残基数は 1,000 残基未満であり、好ましくは500 残基未満であり、より好ましく 100 残基未満であり、最も好ましくは 8 ～ 30 残基である。更に、本発明でペプチドおよび変異体を提供するが、前記ペプチドまたは変異体は、全長のアミノ酸残基が8 ～100 残基、好ましくは8～30残基であり、最も好ましくは8～16 残基、すなわち 8、9、10、11、12、13、14、15または16残基である。

【０２２０】

より長いペプチドも適当であり、上の表２に説明されている9 merまたは10 merのペプチドがMHCクラスIペプチドに適しているが、12～15 merがMHCクラスIIペプチドには適している。

【０２２１】

MHC クラスII限定ペプチドに対し、同一コア配列を持つ数種の異なるペプチドがMHC 分子内に提示される。認識Ｔ（ヘルパー）細胞との相互作用は、9～11個のアミノ酸のコア配列により決定されるので、長さの異なる数種の変異体が同一Ｔ（ヘルパー）細胞クローンによって認識される。そのため、コア結合配列を有する長さの異なる数種の変異体は、N－またはC－末端で処理やトリミングを必要とせずに、MHCクラスII分子を直接負荷するのに使用される。したがって、本発明のペプチドとのT細胞交差反応を誘導する天然発生変異体あるいは人工的変異体は、しばしは長さが異なる変異体である。

【０２２２】

約12アミノ酸残基より長いペプチドがMHCクラスII分子の結合に直接使用われる場合、

コアHLA結合部位に隣接するアミノ酸残基は、MHCクラスII分子の結合溝への特異的結合あるいは、T（ヘルパー）細胞にペプチドを提示するペプチド能力に実質上影響しない残基であることが好ましい。しかし、上記に記載されたとおり、より大きなペプチドは適当な抗体提示細胞によって断片化されるため、ポリペプチドによってコードされる場合など、このようなより大きなペプチドが利用可能であることが理解される。しかし、同じ例であっても、領域に隣接するコア配列は同一コア配列の参照ペプチドに比較して、MHCクラスII分子に結合するペプチドに影響するか、あるいは、MHC－ペプチド二量体のTCRとの両方向での相互作用に影響することが示されている。ペプチド分子内の三次構造（例、ループ形成）は普通、MHCまたはTCRへの親和性を減少させる。ペプチド結合の溝以外にも、MHCまたはTCRの一部に隣接する領域の分子内相互作用がその作用を安定化させる。これらの親和性の変化が、MHCクラスIIペプチドによるT（ヘルパー）細胞応答誘導の可能性に大きく影響を与えうる。

【０２２３】

また、通常8～10アミノ酸長のMHCクラスIエピトープは、実際のエピトープを含んだより長いペプチド、またはタンパク質からプロセシングされたペプチドから作製することも可能である。実際のエピトープの態様に位置する残基は、実際のエピトープを処理中に曝露するのに必要なタンパク質開裂に、実質的に影響しないものであることが好ましい。

【０２２４】

それ故、好ましくは、配列番号：１～３０の群からなるコア配列を持ち、C末端および／またはN末端が1～10アミノ酸伸長したペプチドであり、より好ましくは、これらの隣接アミノ酸の全数が1～12残基、より好ましくは1～10残基、より好ましくは1～8残基、より好ましくは1～6残基であり、より好ましくは1～4残基、さらにより好ましくは1～2残基であり、前記ペプチドが配列番号：１～３０のいずれかの前記ペプチドと同様に、なおもHLA分子に結合できるならば、前記隣接アミノ酸はC末端およびN末端にどのような比率でも分配することができる（例えば、全ての隣接アミノ酸を片方の末端に加えるか、前記アミノ酸を両方の末端に等しく、又は他のいかなる比率でも加えることができる）。

【０２２５】

前記隣接アミノ酸はin vivoにおいてペプチド分解速度を減速させることができ、ＣＴＬが利用できる実際のペプチド量が、隣接アミノ酸がないペプチドと比較して多くなり、したがって、プロドラッグとして作用する。

【０２２６】

更に本発明は、MHCクラスIエピトープのペプチドおよび変異体も提供し、このペプチドまたは変異体の全長は、8～100アミノ酸残基であり、好ましくは8～30残基であり、最も好ましくは8～16残基、すなわち8、9、10、11、12、13、14、15または16残基である。

【０２２７】

当然のことながら、本発明のペプチドまたは変異体は、ヒト主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩあるいはＩＩ分子に結合する能力を持つ。ペプチドまたは変異体のMHC分子への結合は、異なるMHCクラスII対立遺伝子に関する文献(例えば(Vogt et al., 1994; Malcherek et al., 1994; Manici et al., 1999; Hammer et al.,1995; Tompkins et al., 1993; Boyton et al., 1998))に記載されているように、当該分野で知られる方法でテストされる。

【０２２８】

本発明の特に好ましい実施形態において、ペプチドは、配列番号：１～３０に示されたアミノ酸配列からなるか、または、から本質的になる。

【０２２９】

「から本質的になる」とは、本発明に記載のペプチドが、配列番号：１～３０のいずれかに記載の配列またはその変異体に加え、さらにMHC分子エピトープのエピトープとして機能するペプチドの形成に必要とされない、付加的にＮ末端および／またはＣ末端に位置する、アミノ酸のストレッチ（ｓｔｒｅｔｃｈ）を含むことを意味する。

【０２３０】

いずれにせよこれらのストレッチは、本発明に記載のペプチドを細胞内に効率的に導入するのに重要である。本発明の一実施形態において、ペプチドは、NCBI、すなわちGenBankAccession-number X00497由来HLA－DR抗原関連変異体鎖（p33、“Ii”に続く）の80N末端アミノ酸からなる融合タンパク質である(Strubin, M. et al 1984)。

【０２３１】

更に、ペプチドまたは変異体は、より強い免疫応答を引き起こすため、ＭＨＣ分子に対する安定性および／または結合性をより向上できるように修飾される。そのようなペプチド配列の最適化の方法は、当該分野では良く知られており、逆方向ペプチド結合または非ペプチド結合の導入などがある。

【０２３２】

逆方向ペプチド結合において、アミノ酸残基はペプチド（-CO-NH-）結合ではなく、逆向きに結合している。このようなレトロインバーソ型ペプチド模倣物は、例えば、参照文献として引用されるMeziere et al (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237に記載のように、該分野で知られている方法で作製される。この方法では、骨格の変化はあるが側鎖方向は変化させずに擬ペプチドを作製する。Mezierеら(1997)は、これらの擬ペプチドが、MHC結合とヘルパーＴ細胞応答に有効であることを示した。CO－NH結合の代わりにNH－CO結合を含むレトロインバーソペプチドは、タンパク質分解にかなり耐性がある。

【０２３３】

非ペプチド結合とは、例えば、-CH_2-NH、-CH_2S-、-CH_2CH_2-、-CH=CH-、-$COCH_2$-、-CH(OH)CH_2-、およびCH_2SO-などのことである。米国特許No.4,897,445では、標準方法で合成したポリペプチドを含むポリペプチド鎖内の非ペプチド結合と、$NaCNBH_3$存在下アミノアルデヒドとアミノ酸を反応させ合成した非ペプチド結合（-CH_2-NH）の固相合成法が提供されている。

【０２３４】

上述の配列を持つペプチドは、アミノ末端および／またはカルボキシ末端にある別の化学基とともに合成され、安定性、バイオアベイラビリティ、および／またはペプチドへの親和性を促進する。例えば、カルボベンゾキシル基、ダンシル基、またはt－ブチルオキシカルボニル基などの疎水基は、ペプチドのアミノ末端に付加できる。同様に、アセチル基または9－フルオレニルメトキシ－カルボニル基をペプチドのアミノ末端に付加することもできる。更に、疎水基、ｔ－ブチルオキシカルボニル基、またはアミノ基が、ペプチドのカルボキシ末端に付加される。

【０２３５】

更に、本発明のペプチドは、その立体配置が変化するように合成される。例えば、通常のL異性体の代わりに、前記ペプチドの1個またはそれ以上のアミノ酸残基のD異性体を使用する。更に、本発明のペプチドの少なくとも1つのアミノ酸残基を、既知の合成アミノ酸残基の1つに置換してもよい。このような変化は、本発明のペプチドの安定性、バイオアベイラビリティ、および／または結合作用を向上させることもある。

【０２３６】

同様に、本発明のペプチドまたは変異体は、ペプチド合成の前後において、特定のアミノ酸と反応して化学的に修飾することもできる。このような改変は、当該分野では良く知られており、本明細書で参考文献として引用した、R.Lundblad, Chemical Reagents for Protein Modification, 3rd ed. CRC Press, 2005などに要約されている。アミノ酸の化学的修飾としては、アシル化、アミジン化、リジンのピリドキシル化、還元的アルキル化、2,4,6－トリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）によるアミノ基のトリニトロベンジル化、カルボキシル基のアミド修飾、およびシステインからシステイン酸への過蟻酸酸化によるスルフィドリル修飾、水銀誘導体の形成、他のチオール化合物との混合ジスルフィドの形成、マレイミドとの反応、ヨード酢酸またはヨードアセトアミドとのカルボキシメチル化、およびアルカリ性pH下でのシアン酸塩とのカルバモイル化が挙げられるが、これだけに限定されない。これに関して、当業者は、より広義なタンパク質の化学改変方法論について、”Current Protocols In ProteinScience, Eds. Coligan et al. (John Wiley&

Sons NY 1995-2000)の１５章を参照されたい。

【０２３７】

治療用のタンパク質およびペプチドをPEGによりうまく修飾できると、しばしば循環血液中の半減期の延長につながり、一方、グルタルアルデヒト、ポリエチレングリコールジアクリレート、およびホルムアルデヒドによるタンパク質の架橋は、ヒドロゲルの調製用として使われる。免疫療法のためのアレルゲンの化学的修飾は、しばしばシアン酸カリウムとのカルバミル化によって達成される。

【０２３８】

ペプチドまたは変異体、ここでペプチドは修飾されるか非ペプチド結合を含むが、本発明の好ましい実施形態である。一般的に、ペプチドおよび変異体（少なくともアミノ酸残基間にペプチド連鎖を持つ）は、Luら(1981)および参考文献で公表されているように、固相ペプチド合成のFmoc-ポリアミドモードによって合成される。一時的なＮ－末基の保護には9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）基が使われる。塩基に非常に不安定なこの保護基の反復性開裂は、20%ピペリジンのN,N－ジメチルホルムアミド溶液で実施される。側鎖の官能性は、ブチルエーテル（セリンスレオニンとチロシンの場合）、ブチルエステル（グルタミン酸とアスパラギン酸の場合）、ブチルオキシカルボニル誘導体（リジンとヒスチジンの場合）、トリチル誘導体（システインの場合）、そして4－メトキシー2，3，6－トリメチルベンゼンスルホニル誘導体（アルギニンの場合）として保護される。グルタミンまたはアスパラギンがC末端残基の場合、官能性側鎖アミドの官能性の保護に4,4'－ジメトキシベンズヒドリル基を用いたものもある。固相の支持体は、ジメチルアクリルアミド(骨格モノマー)、ビスアクリロイルエチレンジアミン（架橋剤）およびアクリロイルサルコシンメチルエステル（官能基化剤）の3つのモノマーからなるポリジメチルアクリルアミドポリマーに基づいている。ペプチド樹脂の開裂可能な連結剤には、酸に不安定な4－ヒドロキシメチル－フェノキシ酢酸誘導体を使う。全てのアミノ酸誘導体は予め作られた対称の無水物誘導体として付加されるが、アスパラギンおよびグルタミンは例外であり、これらはN、N-ジシクロヘキシル－カルボジイミド/１－ヒドロキシベンゾトリアゾールで仲介される非対称性カップリング反応により付加される。全てのカップリングと脱保護反応はニンヒドリン、トリニトロベンゼンスルホン酸もしくはイソチン（isotin）テストで測定される。合成が終了すると、ペプチドは、50% 捕捉剤を含む 95%トリフルオロ酢酸の処理による側鎖保護基の除去と同時に樹脂支持体から開裂する捕捉剤には一般的にエタンジチオール、フェノール、アニソールおよび水が使われるが、適格な選択は合成されるペプチドの構成アミノ酸に依存する。また、ペプチド合成では固相法および溶液相法の組み合わせも可能である（Bruckdorfer et al. 2004および本明細書の参考文献などを参照）。

【０２３９】

真空で蒸発しトリフルオロ酢酸を除去し、続いてジエチルエーテルで粉末とし、粗ペプチドを得る。捕捉剤はすべて単純な抽出作業で除去され、液相の凍結乾燥で捕捉剤不含の粗ペプチドが得られる。ペプチド合成の試薬はCalbiochem－Novabiochem（UK）LTd（NottinghamNG7,UK）などで入手できる。

【０２４０】

精製は、再結晶、分子篩クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、および（通常）アセトニトリル/水の勾配分離などによる逆相高速液体クロマトグラフィーの１つあるいは組み合わせて実施する。

【０２４１】

ペプチド解析は、薄層クロマトグラフィー、電気泳動、特にキャピラリー電気泳動、固相抽出（CSPE）、逆相高速液体クロマトグラフィー、酸加水分解後のアミノ酸分析および、高速原子衝撃（FAB）質量分析法、そしてMALDIおよびESI-Q-TOF質量分析法にて行われる。

【０２４２】

本発明のさらなる一態様では、ペプチドもしくは変異体をコードする核酸（例、ポリヌ

クレオチド）を提供する。捕捉剤不含のポリヌクレオチドはDNA、cDNA、PNA、CAN、RNAもしくはその組み合わせなどであり、一本鎖および／または二本鎖、天然型または安定型であり、例えばホスホロチオエート結合骨格を有するポリヌクレオチドなどであり、また、ポリペプチドをコードしている限り、イントロン含有または不含どちらの場合であってもよい。当然のことながら、そのポリペプチドはポリヌクレオチドでコードが可能な天然発生のペプチド結合によって連結される、天然発生のアミノ酸残基を含むペプチドのみである。更に、本発明のさらなる観点では、本発明に記載のポリペプチドを発現できる発現ベクターを提供する。

【０２４３】

ポリヌクレオチド、特にDNAをベクターに例えば、相補的に結合力のある末端を介して連結させる様々な方法が開発されている。例えば、相補的ホモポリマーの束がDNAセグメントに付加され、ベクターDNAに挿入される。そして、ベクターとDNAセグメントは、相補的ホモポリマーの尾部間で水素結合し、組み換えDNA分子を形成する

【０２４４】

合成リンカーは１個以上の制限部位を含み、DNAセグメントとベクターが連結する代替方法を提供する。様々な制限エンドヌクレアーゼ部位を持つ合成リンカーはInternational Biotechnologies Inc.(New Haven, CN, USA)などの多くの企業から市販されている。

【０２４５】

本発明のポリペプチドをコードする DNA 修飾には、Saiki et al (1988) によって開示されているポリメラーゼ鎖反応を用いることが望ましい。例えば適切な制限部位中で設計することにより、 DNA を適切なベクターに導入する際、または、当該分野で既知の他の有用な方法でDNA を修飾する際、この方法が使用される。

ウイルス性ベクターを使用する場合は、ポックスベクターあるいはアデノウイルスベクターが好ましい。

【０２４６】

続いてDNA（レトロウイルスベクターの場合、RNA）を適切な宿主にて発現し、本発明のペプチドもしくは変異体からなるポリペプチドを生成してもよい。こうして、本発明のペプチドまたは変異体をコードするDNAを、本明細書に記載の指導的見解で改変した既存技術を使用し、発現ベクターを構築し、続いてその発現ベクターを使い、本発明のポリペプチドの発現と生産するのに適切な宿主細胞に導入する。該技術には、米国特許No.4,440,859、4,530,901、4,582,800、4,677,063、4,678,751、4,704,362、4,710,463、4,757,006、4,766,075およびで開示されたものが含まれる。

【０２４７】

本発明の化合物を構成するポリペプチドをコードするDNA（レトロウイルスベクターの場合、RNA）は、適切な宿主の導入のために、他の各種配列と連結される。随伴DNAは、宿主の性質、DNAの宿主への導入方法、およびエピソームの維持または組み込みの要求によって決まる。

【０２４８】

一般的に、DNAは、発現の適切な配向と正しいリーディングフレームで、プラスミドなどの発現ベクターに挿入される。必要に応じて、DNAは、目的とする宿主に認識される適切な転写および翻訳の調節制御核酸の配列に連結されるが、そのような制御は発現ベクターで行われる。続いてベクターは、標準的な技術で宿主に導入される。一般的には、全ての宿主がベクターによって形質転換されるわけではない。それ故、形質転換する宿主細胞を選択する必要となる。選択技術の１つに、全ての必要な制御エレメントとともに、抗体耐性のような形質転換細胞内で選択可能な形質をコードする、発現ベクターのDNA配列に組み込む方法がある

【０２４９】

代わりに、このような選択的形質に対する遺伝子は、別のベクター上に存在できるため、そのベクターを使って目的の宿主細胞を同時に形質転換することもできる。

【０２５０】

本発明の組み換えDNAによって形質転換された宿主細胞は、続いて本明細書に開示されている指導的見解で当業者に既知の適切な条件下で、十分時間培養され、ポリペプチドの発現を可能にし、次いで回収される。

【０２５１】

バクテリア（大腸菌、枯草菌など）、酵母（出芽酵母など）、糸状菌類（アスペルギルス属など）、植物細胞、動物細胞、および昆虫細胞など、多数の発現系が知られている。発現系は、ATCC Cell Biology Collection で入手可能なCHO細胞など哺乳動物細胞であることが好ましい。

【０２５２】

構成的発現用の哺乳動物細胞の典型的なベクタープラスミドは、適切なポリＡ尾部とネオマイシンなどの耐性マーカーを伴ったCMVもしくはSV40プロモーターを含む。一例は、Pharmacia(Piscataway, NJ, USA) で入手可能なpSVLである。哺乳動物の誘導発現ベクターの１例は、pMSGであり、Pharmaciaから入手できる。有用な酵母プラスミドベクターは、pRS403－406とpRS413－416であり、Stratagene Cloning Systems, (La Jolla, CA 92037, USA)で入手可能である。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405、pRS406は酵母組み込みプラスミド（YIps）であり、酵母選択マーカーHIS3、TRP1、LEU2およびURA3が組み込まれている。プラスミドpRS413－416は酵母動原体プラスミド（Ycps）である。CMVプロモーターベクター（Sigma-Aldrichなどで入手可）は、一時的な発現もしくは安定した発現、細胞質発現もしくは分泌、また、FLAG、3xFLAG、c-mycあるいは MATの様々な組み合わせにおけるN末端またはC末端の標識化を提供する。これらの融合タンパクによって組み換えタンパクの検出、精製および分析が可能である。二重標識融合により検出に柔軟性を与えている。

【０２５３】

強力なヒトサイトメガロウイルスのプロモーター調節領域は、COS細胞中のタンパク質発現レベルを1mg／Lと高く推進する。作用が弱い細胞株では、典型的なタンパク質レベルは約0.1mg/Lである。SV40 の複製開始点が存在すると、SV40 の複製が許容されるCOS細胞において DNA複製レベルが高くなる。例えばCMVベクターは、バクテリア細胞の複製開始点であるpMB1（pBR322誘導体）、バクテリアのアンピリシン耐性を選択するｂ-ラクタマーゼ遺伝子、hGHポリA、およびf1開始点を含むことができる。プレプロトリプシンリーダー（PTT）の配列を含むベクターは、ANTI－FLAG抗体、樹脂およびプレートを使って、FLAG融合タンパクの培地への分泌を命ずることができる。他のベクターや発現系が、様々な宿主細胞を使う当該分野においてよく知られている。

【０２５４】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドベクター構築物により形質転換した宿主細胞を提供する。宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞であってもよい。一部の状況では細菌細胞が好ましい原核生物の宿主細胞であり、典型的なものは、例えばBethesdaResearch Laboratories Inc.,（Bethesda、MD、USA） から譲渡可能なDH5株、または米国培養細胞系統保存機関 （ATCC）から譲渡可能なRP1などの大腸菌の菌株である。真核生物の好ましい宿主細胞は、酵母、昆虫および哺乳動物の細胞であり、好ましくはマウスやラット、サル、ヒトの繊維芽細胞や大腸細胞株など脊椎動物由来の細胞である。酵母の宿主には、StratageneCloning Systems (La Jolla, CA 92037, USA) から入手可能なYPH499、YPH500、YPH501がある。哺乳動物細胞の宿主として好ましいものは、ATCCからCCL61として入手可能な、チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO）、ATCCからCRL 1658として入手可能なNIH スイスマウス胎児由来細胞NIH/3T3、ATCCからCRL 1650として入手可能なサル腎臓由来COS-1細胞、およびヒト胎児由来腎臓細胞である293細胞である。好ましい昆虫細胞は、バキュロウイルス発現ベクターを導入可能なSf9細胞である。発現に適した宿主細胞の選択方法についての概要は、Paulina Balbas and Argelia Lorence "Methods in Molecular Biology Recombinant Gene Expression, Reviews and Protocols," Part One, Second Edition, ISBN 978-1-58829-262-9などの教科書や、当業者に知られている他の文献に記述されている。

【０２５５】
本発明におけるDNA構築物の適切な宿主細胞への形質転換は周知の方法で実施され、それは使用されるベクターの種類により異なる。原核生物細胞の形質転換については、例えばCohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110やSambrook et al (1989)Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYなどの文献を参照する。酵母の形質転換については、Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NYに説明されている。また、 Beggs (1978)Nature 275,104-109 に記述された方法も有用である。脊椎動物細胞では、形質移入（形質移入）については、例えばリン酸カルシウムやDEAEデキストラン、またはリポソーム製剤などの細胞を形質移入するのに有用な試薬は、StratageneCloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USAから入手可能である。電気穿孔法も細胞の形質転換および／または形質移入に有用であり、酵母や細菌、昆虫細胞、脊椎動物細胞の転換は当該分野では良く知られている。
【０２５６】
形質転換に成功した細胞、すなわち本発明のDNA構築物を有する細胞は、PCRなどの周知の技術で同定できる。代わりに抗体を使って、上清中にタンパク質の存在を検出できる。
【０２５７】
本発明における特定な宿主細胞、例えば細菌、酵母、昆虫細胞などが、本発明のペプチドの調製に有用であることは理解される。しかしながら、特定な治療方法においては他の宿主細胞も有用なこともある。例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞は、ペプチドが適切なMHC分子に負荷されるように、本発明のペプチドを発現させるのに有用に使用されることもある。したがって現行の本発明は、本発明に記載の核酸または発現ベクターを有する宿主細胞も提供する。
【０２５８】
好ましい実施形態において、宿主細胞は抗原提示細胞、特に樹状細胞または抗原提示細胞である。前立腺性酸性ホスファターゼ（PAP）含有組換え融合タンパク質で負荷されたAPCは、現在前立腺癌(Sipuleuce－T)治療に向けて研究中である。
【０２５９】
本発明の別な一態様では、ペプチドまたはその変異体の生成方法、宿主細胞を培養し、ペプチドを宿主細胞あるいはその培養液から単離する方法を提供する。
【０２６０】
別の実施形態では、本発明のペプチド、核酸または発現ベクター薬剤として使用される。例えば、ペプチドまたはその変異体を、静脈内注射（i.v.）、皮下注射（s.c.）、皮内注射（i.d.）、腹腔内注射（i.p.）または筋肉内注射（i.m.）として調製してもよい。ペプチド好ましい注射方法は、s.c.、i.d.、i.p.、i.m.とi.v. である。DNAの好ましい注射方法は、i.d.、i.m.、s.c.、i.p.とi.v.である。ペプチドまたはDNAの投与量は、例えば50 μg～1.5mgであり、好ましくは 125 μg～500 μg,であり、投与量は各ペプチドや DNAにより異なる。 この範囲の投与量は以前行われた臨床試験で使用され成功したものである(Brunsviget al 2006; Staehler et al 2007)。
【０２６１】
本発明の別な一態様は、活性化T細胞の体外での生成方法、つまり抗原特異的方法でT細胞を活性化させるのに充分な時間をかけて、適切な抗原提示細胞の表面に発現した、抗原負荷ヒトMHCIおよびII分子を、生体外でＴ細胞と接触させる方法である。充分な量の抗原を抗原提示細胞とともに使用するのが好ましい。
【０２６２】
MHCクラスIIエピトープが抗原として使われている場合、T細胞はCD4陽性ヘルパー細胞であり、好ましくはT_{H1}タイプである。MHCクラスII分子はあらゆる適切な細胞表面に発現される。（MHCクラスII分子を発現させるために細胞を形質移入する場合）当該細胞は天然でMHCクラスII分子を発現していないのが好ましい。代わりに、細胞が天然でMHCクラスII分子を発現している場合は、抗原の処理または抗原提示の経路が欠けていることが好ま

しい。この場合、MHCクラスII分子の発現細胞が、T細胞を活性化する前に、選択されたペプチド抗原で完全に負荷されることが可能となる。

【０２６３】

抗原提示細胞（または活性化細胞）は、典型的にはその表面にMHCクラスII分子を有し、前記MHCクラスII分子を選択した抗原で負荷される能力を、それ自体実質的に持たないことが好ましい。MHCクラスII分子は、選択した抗原とinvitroで直ちに負荷される。

【０２６４】

好ましくは、哺乳動物細胞が、TAPペプチドトランスポーターを欠いているか、その発現または機能が低下していることである。TAPペプチドトランスポーターを欠いた適切な細胞は、T2、RMA-Sやショウジョウバエの細胞である。TAPはTransporter associated with Antigen Processing（抗原プロセシング関連輸送体）のことである。

【０２６５】

ヒトペプチド負荷欠損細胞株Ｔ２は、米国培養細胞系統保存機関（American TypeCulture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA)からカタログ番号CRL1992として、また、ショウジョウバエのSchneiderline 2は、同じく米国培養細胞系統保存機関からカタログ番号CRL19863として入手可能であり、またマウスのRMA-S株についてはKarreら(1985)の文献に記述されている。

【０２６６】

便宜上、形質移入する前記宿主細胞は、実質的にMHCクラスI分子を発現していないとする。また、刺激細胞が、B7.1, B7.2, ICAM-1やLFA 3のいずれかのように、Ｔ細胞同時刺激シグナルを与えるのに重要な分子を発現しているのが好ましい。

多数のMHCクラスII分子や同時刺激分子の核酸配列は、GenBankとEMBLのデータベースから入手可能である

【０２６７】

同様に、MHCクラスIエピトープが抗原として使われる場合、T細胞はCD8陽性ＣＴＬである。

【０２６８】

抗原提示細胞がこのようなエピトープを発現させるために形質移入された場合、好ましくは前記細胞が、配列番号：１～３０のペプチドまたはその変異体アミノ酸配列を発現可能な発現ベクターを有することである。

【０２６９】

他の方法をin vitroでのＣＴＬの生成に多数使用してもよい。例えば、Peoplesら(1995)およびKawakamiら(1992)の論文に記載の方法では、ＣＴＬの作製に自己腫瘍浸潤リンパ球を用いている。Plebanskiら(1995)は自己末梢血リンパ球(PLB)をＣＴＬの調製に使用している。Jochmus らは(1997)は、ペプチドまたはポリペプチドで鼓動させるか、または組換えウイルスの感染を通じて、自己ＣＴＬを生成する方法について記述している。Hillら(1995)とJeromeら(1993)は、Ｂ細胞を自己ＣＴＬの生成に使用している。更に、ペプチドまたはポリペプチドで鼓動させたか、または組換えウイルスで感染させたマクロファージを用いて、自己ＣＴＬを調製してもよい。S.Walter らは(2003)は、人工抗原提示細胞(aAPC)を用いた、Ｔ細胞のin vitroでのプライミング（初回抗原刺激）について説明しており、これは、選択したペプチドに対するＴ細胞の作製方法としても適している。この研究では、aAPCを、ビオチン-ストレプトアビジン生化学手法により、ポリスチレン粒子（微小粒子）の表面に機能したMHC:ペプチド複合体をカップリングさせて作製した。本システムは、aAPC上のMHC密度を正確に制御できるため、血液試料から高い効率で、抗原特異性が高いあるいは低いT細胞応答を選択的に引き出すことができる。aAPCは、MHC:ペプチド複合体とは離れて、その表面にカップリングした同時刺激活性様抗CD28抗体と共に他のタンパク質をその表面に運ぶ必要がある。更に、このようなaAPCに基づくシステムは、しばしばインターロイキン12様サイトカインなどの適切な可溶性因子の添加が必要である。

【０２７０】

同種細胞をT細胞の調製に使ってもよく、詳しい方法はWO97/26328に記載されている。例

えば、ショウジョウバエ細胞とＴ２細胞に加え、他の細胞を使用して、CHO細胞やバキュロウイルスに感染した昆虫細胞、細菌、酵母、ワクチンに感染した標的細胞などの抗原を提示してもよい。さらに、植物ウイルスを使用してもよく(例えば、Porta et al (1994)参照)、そこでは外来ペプチドの提示のための高収率システムとして、ササゲモザイクウイルスの開発について説明している。

【０２７１】

本発明のペプチドに注目した活性化T細胞は治療に有用であるしたがって、本発明の別な一態様では、本発明の前述の方法で得られる活性化T細胞を提供する。

【０２７２】

上記の方法で生産された活性化T細胞は、配列番号:１～３０のアミノ酸配列を含んだポリペプチドを異常に発現する細胞を選択的に認識する

【０２７３】

好ましくは、T細胞がそのTCRとHLA/ペプチド複合体の相互作用（例えば、結合）により細胞を認識することである。このようなT細胞は、本発明のアミノ酸配列を含んだポリペプチドを異常に発現する標的細胞を持つ患者で、標的細胞を殺す方法には有用であり、ここで、患者には効果的な数の活性化T細胞が投与される。患者に投与するT細胞は、その患者に由来し上記の方法で活性化されたものであってもよい（すなわち、これらは自己T細胞である）。代わりに、T細胞は患者に由来せず、他の個人に由来してもよい。もちろん、個人は健康であることが好ましいここでいう「健康な個人」とは、健康状態にあり、好ましくは十分な免疫系を持ち、さらに好ましくは、容易に検査/検出できるいかなる疾患にも患っていない個人を意味する。

【０２７４】

体内で、本発明に記載のCD4陽性T細胞の標的細胞は、腫瘍細胞（MHCクラスII分子を時に発現する）および／または腫瘍（腫瘍細胞）をとりまく間質細胞（MHCクラスII分子を時々発現(Dengjel et al., 2006) ）であってもよい。

【０２７５】

本発明のT細胞を治療組成物の有効成分として使用してもよい。従って本発明は、本発明のアミノ酸配列を含んだポリペプチドを異常に発現する標的細胞を持つ患者で、標的細胞を殺す方法、つまり上記に記載したとおり、患者に効果的な数の活性化T細胞を投与する方法も提供する。

【０２７６】

ここでいう「異常に発現する」とは、ポリペプチドが正常レベルに比べ過剰発現していること、または、腫瘍が由来する組織においては発現していないが腫瘍では発現していることを意味する。また、ここでいう「過剰発現」とは、ポリペプチドが、正常な組織と比較して少なくとも1.2倍、好ましくは少なくとも2倍、さらに好ましくは少なくとも5倍または10倍発現していることを意味している。

【０２７７】

T細胞は、上述のような当該分野で既知の方法で得てもよい。

【０２７８】

この、いわゆるT細胞の養子細胞移植のプロトコールは、当該分野では周知であり、文献（Rosenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988; Dudley et al., 2002; Yee et al., 2002; Dudley et al., 2005)や総説 (Gattinoni et al., 2006)および (Morgan et al.,2006)に記載されている。

【０２７９】

ペプチドや核酸、発現ベクター、細胞、活性化ＣＴＬ、T細胞レセプターやこれをコードする核酸など、本研究のいずれの分子も、細胞が免疫応答から逃れる特徴を持つ疾患の治療に有用である。それ故、本発明のすべての分子を、薬剤として、または薬剤の製造において使用される。これらの分子を単独で、または本発明における他の分子や既知の分子と組合せて使用してもよい

【０２８０】

本発明の薬剤はワクチンが好ましい。本ワクチンは患者に直接、または影響を受けた器官に、またはi.d.、i.m.、s.c.または i.v. により全身に投与するか、また、その後患者に投与される、患者またはヒト細胞株に由来の細胞を ex vivoで適用するか、あるいはin vivo で使用して、その後患者に投与される、患者由来の免疫細胞のサブ集団を選択する。 細胞にIn vitroで核酸を投与する場合は、インターロイキン２などの免疫刺激サイトカインを同時発現できるように核酸を形質移入することが、細胞にとって有用なこともある。ペプチドはまた、キーホール無脊椎ヘモシアニン（HLH）またはマンナンなどにペプチドを接合させることも有用である（WO95/18145およびLongenecker et al (1993)参照）。ペプチドはまた標識化され、あるいは融合タンパク質であるか、ハイブリッド分子である。その配列が本発明で与えられるペプチドは、CD8陽性ＣＴＬを刺激することが期待される。しかしながら、CD4T－ヘルパー細胞により提供される助けの存在で、CD8ＣＴＬの刺激はより効率的になる。したがって、CD8ＣＴＬを刺激するMHCクラスIエピトープに対し、融合パートナーまたはハイブリッド分子のセクションは、CD4陽性T細胞を刺激するエピトープを適切に提供する。CD4およびCD8を刺激するエピトープは、該分野で良く知られており、本発明により同定されたエピトープを含む。

【０２８１】

本発明の一形態において、ワクチンは、配列番号：１または２０と少なくとも１つの追加ペプチドで示されたアミノ酸配列を有する１種以上のペプチド、好ましくは2～50 種、より好ましくは2～25種、さらに好ましくは2～15種、最も好ましくは、2、3、4、5、6、7、8、9，10、11、12、または13種のペプチドを含む。これらのペプチドは１つまたは複数の特定なＴＡＡに由来し、MHCクラスI分子とクラスII分子の一方またはその両方に結合してもよい。

【０２８２】

ポリヌクレオチドは実質的に純粋であり、適切なベクターまたは送達系に含まれる。核酸はDNA、cDNA、PNA、CAN、RNAまたはこれらの組合せである。このような核酸の設計や導入方法は、当該分野では良く知られている。概要は、Pascolo S. 2006、Stan R.2006、あるいはA Mahdavi 2006などに記述されている。ポリヌクレオチドワクチンは簡単に調製できるが、これらのベクターが免疫応答を誘導する作用様式については完全には解明されていない。適切なベクターと送達系は、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルスや、複数のウイルスのエレメントを含む複合体などを基にした、ウイルスDNAやウイルスRNAの一方またはその両方である。ウイルスなしの送達系は、陽イオン性脂質や陽イオン性ポリマーなどで、DNA送達に関する技術分野で良く知られている。「遺伝子銃」などの、物理的な送達法を使用してもよい。核酸でコードされたペプチドまたは複数のペプチドは、例えば、上述した各々の反対側のCDRに対しＴ細胞を刺激するエピトープとの融合タンパク質である。

【０２８３】

本発明の薬剤は、１個または複数のアジュバントを含む。アジュバントは、免疫応答(例えば抗原に対するＣＴＬおよびヘルパーT(T_H)細胞介在による免疫応答)を非特異的に増強または促進するので、そのために本発明の薬剤に役立つと考えられる物質である。適切なアジュバントには、1018ISS、アルミニウム塩、Amplivax、AS15、BCG、CP-870,893，CpG7909、CyaA、dSLIM，フラジェリンもしくはフラジェリン由来のTLR5リガンド、FLT3リガンド、GM-CSF、IC30、IC31、イミキモド(ALDARA)、レジミキモド、ImuFactIMP321、インターロイキン（IL-2、IL-13、IL-21）、インターフェロンα、インターフェロンβ、またはＰＥＧ誘導体、 IS Patch、ISS、ISCOMATRIX、ISCOMs、JuvImmune、LipoVac、MALP2、MF59、モノホスホリル脂質A、モンタニドIMS 1312、モンタニドISA 206、モンタニドISA 50V、モンタニドISA-51、油中水乳剤、水中油乳剤、OK-432、OM-174、OM-197-MP-EC、ONTAK、OspA、PepTel（登録商標）ベクターシステム、PLGおよびデキストラン微小粒子、レシキモド、SRL172、ビロソームおよび他のウイルス様粒子、YF-17D、VEGF トラップ、R848、βグルカン、Pam3Cys、Aquila'sQS21 stimulon (サポニン、マイコバクテリア抽出物および合成バクテリア細胞壁模倣体から誘導される)、およびRibi's Detox、Quil、あるい

はSuperfosなどのその他の適当なアジュバントが含まれが、それだけに限定されるものではない。フロイントもしくはGM-CSFなどのアジュバントなども好ましい。樹状細胞に特異ないくつかの免疫アジュバント(ＭＦ５９など)およびその調製は前述されている(Dupuis M etal 1998; Allison 1998)。またサイトカインを使用してもよい。いくつかのサイトカインは、リンパ系組織(例えばTNF-α)への樹状細胞の移動に対する影響、Tリンパ球(例えばGM-CSF、IL-1、IL-4)のために効率的な抗原提示細胞への樹状細胞の成熟の加速に(米国特許No.5,849,589、その全体を本明細書の参考文献として明確に引用している)、さらに免疫アジュバント(例えばIL-12、IL-15、IL-23、IL-7、IFN-α、IFN-β)としての作用などに、直接関連がある(Gabrilovichet al 1996)。

【０２８４】

CpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドも、ワクチン環境におけるアジュバントの作用を増強することが報告されている。理論に拘束されずに、CpGオリゴヌクレオチドは、トール様受容体（TLR）、主としてTLR９によって生来の(適応できない)免疫系を活性化することで作用する。CpGによって誘導されたTLR9活性化は、ペプチドもしくはタンパク抗原、生ウイルスもしくは死滅ウイルス、樹状細胞ワクチン、自家細胞ワクチン、および予防／治療用ワクチン両方の多糖類接合体を含む、種々様々の抗原に対する抗原特異的体液性および細胞性免疫応答を増強する。更に重要なことには、そのCpGは、CD4T細胞の助けがない状態でさえ、樹状細胞の成熟および分化を増強し、T_{H1}細胞の活性化の増強、および強力な細胞傷害性リンパ球(ＣＴＬ)生成をもたらす。TLR9刺激により誘導されたT_{H1}バイアスは、通常、T_{H2}バイアスを促進するミョウバンもしくは不完全なフロイントのアジュバント(IFA)のようなワクチンアジュバントが存在する状態でさえ維持される。CpGオリゴヌクレオチドは、他のアジュバントと処方された場合もしくは併用して投与された場合、または微粒子、ナノ粒子、脂肪乳剤などの調製物もしくは同様の調製物の場合、さらに大きなアジュバントの活性を呈するが、それは抗原が比較的弱い場合に、強い応答を誘導するために特に必要である。いくつかの実験において、CpGオリゴヌクレオチドはさらに、免疫応答を加速し、CpGなしの十分量のワクチンに対し同程度の抗体反応を伴いながら、抗原用量を約2桁低減し得る(Krieget al 2006)。米国特許6,404,705 B1は、抗原特異性免疫応答を誘導するためにCpGオリゴヌクレオチド、非核酸アジュバントおよび抗原を組み合わせた使用について記述している。CpGTLR9拮抗薬は、本発明の医薬組成物の好ましい成分であるMologen(ベルリン、ドイツ)によるdSLIM(ダブルステムループ免疫賦活剤)である。RNA結合TLR7、TLR8および／またはTLR9など、他のTLR結合分子も使用される。

【０２８５】

他の有用なアジュバントの例には、 化学的に修正されたCpGs (例えば、CpR、Idera)、dsRNA類似化合物（Poly(I:C)やAmpliGen）、非CpGバクテリアDNAもしくはRNAの他にも、免疫活性小分子および抗体（シクロホスファミド、スニチニブ、ベバシズマブ、セレブレックス、NCX-4016、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ソラフェニブ、テモゾロマイド、テムシロリムス、XL-999、CP-547632、パゾパニブ、VEGFトラップ、ZD2171、AZD2171、抗ＣＴＬA4およびSC58175）が上げられ、これらは治療としておよび／またはアジュバントとして作用し得るが、それらだけに限定されるものではない。本発明の状況において有用なアジュバントおよび添加物の量および濃度は、必要以上に実験を重ねなくても熟練した当業者により容易に決定されうる。好ましいアジュバントは、dSLIM、インターフェロンαおよびβ、CpG7909、IC31、イミキモド、レシミキモド、PeviTer、RNA、タダラフィル、テモゾロミド、およびJuvImmuneである。

【０２８６】

好ましいアジュバントはdSLIM、BCG、OK432、イミキモド、レシミキモド、GMCSF、インターフェロン－α、PeviTer、およびJuvImmuneまたはその併用である。

【０２８７】

本発明の医薬組成物の好ましい実施形態において、アジュバントは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF、サルグラモスチム）、イミキモド、レシミキモド、インターフェロン－αなどのコロニー刺激因子からなる群から選択される。

【０２８８】
本発明の医薬組成物のさらに好ましい実施形態において、アジュバントはイミキモドまたはレシミキモドである。本発明の医薬組成物のさらに好ましい実施形態において、アジュバントはGM-CSFおよびレシミキモドの併用である。
【０２８９】
この組成物は、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内などの非経口投与、または経口投与に用いられる。このため、ペプチドおよび任意選択の他の分子は、薬剤的に認容可能な、好ましくは水性担体に溶解または懸濁される。更に、前記組成物は緩衝剤、結合剤、爆破剤、希釈剤、香料、潤滑剤などの賦形剤を含むこともできる。前記ペプチドは、サイトカインなどの免疫刺激物質と併用投与することもできる。そのような組成物に使用できる賦形剤の広範なリストは、例えばA.Kibbe, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Ed. 2000, AmericanPharmaceutical Association and pharmaceutical pressなどから引用することができる。前記組成物は、腺腫または癌性疾患の阻止、予防および／または治療に利用することができる。
【０２９０】
本発明は、癌、特に神経膠腫と脳腫瘍、乳癌、前立腺癌、食道癌、大腸癌、腎臓癌、膵臓癌、皮膚の扁平上皮細胞癌とケラチノサイト腫瘍、白血病、肺癌、卵巣癌、およびメラノーマの薬剤を提供する。
【０２９１】
本発明は、次の事項からなるキットを含む:
（ａ）上述の医薬組成物（溶液または凍結乾燥物）を含む容器、
（ｂ）任意で、凍結乾燥調製物の希釈剤あるいは再構成溶液を含む第2容器；
（ｃ）任意で、（ｉ）溶液の使用、または（ｉｉ）凍結乾燥調製物の構成および／または使用の説明書。
【０２９２】
前記キットは更に、（ｉｉｉ）緩衝剤、（ｉｖ）希釈剤、（ｖ）フィルタ、（ｖｉ）針もしくは（ｖｉｉ）注射器の１つまたは複数を含むことがある。前記容器は、好ましくはボトル、バイアル、注射器もしくは試験管であり、容器は再利用してもよい。前記医薬組成物は、好ましくは凍結乾燥される。
【０２９３】
本発明のキットには、好ましくは適切な容器中に本発明の凍結乾燥製剤および再溶解および／または使用に関する説明書が含まれる。適切な容器は、例えば、ボトル、バイアル（例えば、ダブルチャンバーバイアル）、注射器（ダブルチャンバー注射器など）および試験管を含む。前記容器はガラスもしくはプラスチックのような様々な材料から形成される。好ましくは、前記キットおよび／または容器は、再溶解および／または使用の方法を示す、容器あるいはその容器に関連する説明書を含む。例えば、ラベルに、前記凍結乾燥製剤が上述のペプチド濃縮物に再溶解されることを表示してもよい。ラベルは更に、製剤が皮下投与に有用であるか、あるいは皮下投与を意図するものであることを表示してもよい。
【０２９４】
製剤を入れる容器は再利用可能なバイアルとしてもよく、再溶解した製剤の反復投与（例えば2～6回）が許される。キットは更に、適切な希釈剤（例えば重炭酸ナトリウム溶液）を含む、第2容器を含んでもよい。
【０２９５】
希釈剤および凍結乾燥製剤の混合に際して、再溶解した製剤の最終ペプチド濃度は、好ましくは少なくとも0.15mg/mL/ペプチド（＝75μg）であり、好ましくは最高3mg/mL/ペプチド（＝1500μg）までである。前記キットは更に、他の緩衝剤、希釈剤、フィルタ、針、注射器および添付文書と使用説明書を含む、商業上および使用者の観点から見て望ましい他の資材を含む。
【０２９６】

本発明のキットは、他の成分（例えば、他の化合物あるいはこれら他の化合物の医薬組成物）の有無に関わらず、本発明による医薬組成物の製剤を含む単一容器を有してもよく、あるいは各成分を入れる別個の容器を有してもよい。

【０２９７】

好ましくは、本発明のキットは、第2化合物（アジュバント（例えば、GM-CSF）、化学療法剤、天然産物、ホルモンもしくは拮抗薬、抗血管形成薬もしくは阻害剤、アポトーシス誘導剤もしくはキレート剤など）、またはその医薬組成物の併用投与を組み合わせる使用目的で包装された本発明の製剤を含む。前記キットの成分は、あらかじめ複合体を形成するか、または各成分が患者に投与する前に個別の容器に入っていてもよい。前記キットの成分は、1つまたはそれ以上の溶液中、好ましくは水溶液、更に好ましくは無菌水溶液中に提供される。前記キットの成分はまた、固体として提供され、好ましくは他の別個の容器で提供される、適切な溶媒を添加することで液体に変換されてもよい。

【０２９８】

治療用キットの容器は、バイアル、試験管、フラスコ、ボトル、注射器もしくは固体または液体を入れるその他の手段であってもよい。通常、2つ以上の成分がある時、前記キットは第2のバイアルあるいは他の容器を含み、それにより別々の投与が可能となる。前記キットはまた、薬剤的に認容可能な液体用の別の容器を含んでもよい。好ましくは、治療用キットは器具（例えば、1つまたはそれ以上の針、注射器、点眼容器、ピペットなど）を含み、現在のキットの成分である、本発明の薬剤の投与を可能にする。

【０２９９】

現調製物は、経口(腸内)、経鼻、眼、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、もしくは経皮的な任意の受理可能なルートによるペプチドの投与に適するものである。好ましくは、投与はs.c.で、最も好ましくはi.d.である。投与は輸液ポンプにより行ってもよい。

【０３００】

BCA、CLIP2、DTNA、NLGNAX、NR2E1、NRCAMおよび PDPN 由来の本発明のペプチドプドは、神経膠芽細胞腫から単離されたので、本発明の薬剤は好ましくは神経膠芽細胞腫の治療に使用される。

【０３０１】

本発明は、ここで、以下の実施例と図の記述により、その好ましい実施形態を説明するが、この実施例だけに限られるものではない。本発明の目的のため、本明細書で引用されている全ての参考文献が、その全体の参照として組み込まれている。

【０３０２】

図1：原発性腫瘍試料GB6010上にその存在を示すIGF2BP3-001 の典型的な質量スペクトルNanoESI-LCMS は、GBM 試料 GB6010 から溶出したペプチドプール上で実施された。A) m/z 536.3238 ± 0.001 Da,z = 2 での質量分析クロマトグラムは、保持時間49.89 minでペプチドピークを示している。

B) 質量分析クロマトグラムで検出された48.76min でのピークは、質量スペクトルの m/z 536.3239を明らかにした。C) 特定の保持時間でのnanoESI-LCMS 実験で記録された、選択した前駆体m/z 536.3239 から衝突誘導された減衰質量スペクトルで、GB6010 腫瘍試料中の IGF2BP3-001 の存在が確認された。D) 合成IGF2BP3-001のフラグメンテーションパターンが記録され、配列確認のためにCで示した、得られた天然 TUMAPのフラグメンテーションパターンと比較された。

図2a は、選択したタンパク質の正常組織と19個の神経膠芽細胞腫試料おけるmRNA の発現プロフィールを示す。

図2bは、選択したタンパク質の正常組織と19個の神経膠芽細胞腫試料おけるmRNA の発現プロフィールを示す。

図3は、IMA950クラスIのTUMAPの典型的な in vitro 免疫原性を示す。

図4は、本発明のHLA クラスI ペプチドのA*02への典型的な結合親和性を示す。

配列番号:１～２４は、本発明に記載のペプチドに関連する好ましい腫瘍配列を示す。

【実施例】

【０３０３】
ペプチドFTELTLGEF（HLA-A1、PolyPeptideLaboratories、ドイツ、ウォルフェンビュッテル）、LMLGEFLKL（HLA-A2、Clinalfa、スイス、ジサッハ）、およびEPDLAQCFY（HLA-B35、PolyPeptideLaboratories）はすべて製剤品質のものを入手した。
【０３０４】
実施例１：
細胞表面に提示された腫瘍関連ペプチドの同定
組織試料
患者の腫瘍組織は、Hôpital Cantonal Universitaire de Genève（腫瘍免疫学癌治療研究室）とNeurochirurgische Universitäts-Klinik Heidelberg（分子生物学研究室）から提供された。手術前に全ての患者から書面でインフォームドコンセントを得た。組織は、術後直ちに液体窒素で衝撃冷凍し、TUMAPを単離するまで－80℃で保存した。
【０３０５】
組織試料からのHLAペプチドの単離
衝撃冷凍した組織試料のHLAペプチドプールは、わずかに改変したプロトコール（Falk, K. et al 1991;Seeger, F.H. et al.T 1999）に従い、HLA-A*02特異抗体BB7.2またはHLA－A、－B、－C特異抗体W6/32、CNBr-活性化セファロース、酸処理、および限外ろ過により、固体組織から免疫沈降によって得た。
【０３０６】
方法：
得られたHLAペプチドプールをその疎水性に従い逆相クロマトグラフィー（AcquityUPLC system、Waters）により分離し、溶出したペプチドは、ESI源付きLTQオービトラップ型ハイブリッド質量分析計（ThermoElectron）で分析した。ペプチドプールを1.7μmの逆相C18充填剤（Waters）が詰まった分析用溶融石英マイクロキャピラリーカラム（75μm i.d. x 250 mm）に、流速400nL/分とし、直接装填した。Subsequently, the peptides were separatedusing a two-step 180 minute-binary gradient from 10% to 33% B at flow rates of300 nL per minute.勾配は、溶媒A（0.1%蟻酸水溶液）と溶媒B（0.1%蟻酸アセトニトリル溶液）からなる。金被覆ガラスキャピラリー（PicoTip、NewObjective）をマイクロESI源への導入に使った。LTQオービトラップ型質量分析計をTOP5戦略により、データ依存モードで操作した。手短に言えば、オービトラップで（R＝30,000）、高い質量精度の全スキャンからスキャンサイクルを開始し、続いて、以前に選択したイオンを動的排除した5つの最も多量に存在する前駆イオンについて、オービトラップ内で（R＝7500）MS/MSスキャンを実施した。タンデム質量スペクトルは、SEQUESTおよび別の手動コントロールにより解釈した。同定したペプチド配列は、発生した天然ペプチドの断片化パターンを、合成配列の同一参照ペプチドの断片化パターンと比較して確認した。図1は、ペプチドIGF2BP3-001関連MHC クラス I の腫瘍、および UPLC 系のその溶出プロフィールから得られた典型的なスペクトルを示す。
【０３０７】
実施例２：
本発明のペプチドをコードする遺伝子発現プロフィール
ＭＨＣ分子による腫瘍細胞表面に提示されて同定されたペプチドすべてが、免疫療法に適しているとはいえない。その理由は、多くのペプチドが多数の細胞タイプにより発現された正常の細胞タンパク質に由来しているからである。これらのペプチドのほんの僅かだけが、腫瘍に関連しており、由来する腫瘍を認識するのに高い特異性を有するＴ細胞を誘導できる傾向を有している。このようなペプチドを同定し、ワクチン接種により誘導される自己免疫のリスクを最小限にするため、本発明者は多数の正常組織と比較して、腫瘍細胞で過剰発現されるタンパク質に由来するこれらのペプチドに焦点を当てた。
【０３０８】
理想的なペプチドは、腫瘍に特異的で他の組織には提示されないタンパク質に由来する

ことである。理想的なペプチドに近い発現プロフィールを有する遺伝子に由来するペプチドを同定するために、同定したペプチドを、それらが由来するタンパク質と遺伝子にそれぞれ割り当て、これらの発現プロフィールを生成した。

【０３０９】

ＲＮＡ源と予備調製

手術で取り除いた組織標本は、各患者から書面でインフォームドコンセントを得た後、２ヶ所の別な臨床施設（実施例１を参照）から提供された。腫瘍組織標本は、術後直ちに液体窒素でスナップ冷凍し、その後液体窒素下で乳鉢と乳棒を使い均質化した。RNAは，TRIzol（Invitrogen,Karlstuhe, Germany）を用いてこれらの試料から調製し，続いてRNeasy（QIAGEN, Hilden , Germany）でクリーンアップした．両方法とも製造業者プロトコールに従って実施した。

【０３１０】

ヒト健常組織の総ＲＮＡは、市販で得た（Ambion,Huntingdon, UK; Clontech, Heidelberg, Germany; Stratagene, Amsterdam,Netherlands; BioChain, Hayward, CA, USA）。数名の個人（２名～１２３名）から得たＲＮＡを混合して、個々のＲＮＡを等しく加重した。白血球は４名の健常ボランティアの血液試料から単離した。

【０３１１】

すべてのRNA試料の質と量は、RNA6000 Pico LabChip Kit (Agilent).を用いてAgilent 2100 Bioanalyzer (Agilent,Waldbronn, Germany) で測定した。

【０３１２】

マイクロアレイ実験

腫瘍および正常組織のＲＮＡ試料すべての遺伝子発現解析は、AffymetrixHuman Genome (HG) U133A または HG-U133 Plus 2.0 オリゴヌクレオチドマイクロアレイ（Affymetrix, SantaClara, CA, USA）で実施した。すべてのステップは Affymetrix マニュアルにしたがって実施された。簡単にいうと、二本鎖cDNAは、取扱説明書の記載通り、SuperScriptRTII (Invitrogen) と oligo-dT-T7 primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) を用いて、合計5～8 μg のRNAから合成した。in vitro転写は、U133A アレイにはBioArrayHigh Yield RNA Transcript Labelling Kit (ENZO Diagnostics, Inc., Farmingdale,NY, USA)で、U133 Plus 2.0 アレイにはGeneChip IVT Labelling Kit (Affymetrix)で実施し、続いてcRNA のハイブリダイゼーション、および染色は、ストレプタビジン－フィコエリスリンとビオチン化抗ストレプタビジン抗体を用いて実施した。 画像はAgilent2500A遺伝子アレイスキャナー (U133A)またはAffymetrix 遺伝子チップスキャナー 3000 (U133 Plus 2.0) でスキャンし、データは全パラメータの初期設定値を用いてGCOSソフトウェア（Affymetrix）で解析した。正規化は、Affymetrixにより提供された100 個のハウスキーピング遺伝子を使った相対的発現値は、ソフトウェアで得たシングルログ比から計算し、正常腎試料は適宜1.0に設定した。

【０３１３】

本発明の神経膠芽細胞腫で高く過剰発現した本発明の遺伝子源の発現プロフィールを図２に示す。

【０３１４】

実施例３：

IMA950MHCクラスI 提示ペプチドのin vitro免疫原性

本発明のTUMAPの免疫原性について情報を得るため、すでに（Walter,S, Herrgen, L, Schoor, O, Jung, G, Wernet, D, Buhring, HJ, Rammensee, HG, andStevanovic, S; 2003, Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cellsexpanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres, J.Immunol., 171,4974-4978）により報告され、十分確立されたin vitro刺激プラットフォームを用いて検討を行った。本発明の13 HLA-A*0201拘束性TUMAPに対しかなり高い免疫原性を示し得るこの方法は（試験ドナー 50 %以上で、 TUMAP-特異的 ＣＴＬの検出可能性あり）、CD8+ 前駆体T細胞がヒトに存在することに対し、これらのペプチドがT-細胞エピトープであることを明示している（表３）。

本発明の13HLA-A*0201拘束性 TUMAP

【０３１５】

CD8+ T細胞のin vitroプライミング

ペプチド－MHC複合体（pMHC）と抗CD28抗体を載せた人工抗原提示細胞（aAPC）によるinvitro刺激を実行するために、発明者はまず、標準的な密度勾配分離用溶媒（PAA、Coelbe、ドイツ）を使って、新しいHLA-A*02＋バフィーコートからPBMC（末梢血単核細胞）を単離した。バフィーコートは血液バンクのTuebingenまたはKatharinenhospitalStuttgartから入手した。単離されたPBMCは、10％熱不活性化ヒトAB血清（PAA、Coelbe、ドイツ）が補充されたRPMI－グルタマックス（Invitrogen、Karlsruhe、ドイツ）、100U/mlペニシリン／100μg/mlストレプトマイシン（Cambrex、Verviers、ベルギー）、1mMピルビン酸ナトリウム（CCPro、Neustadt、ドイツ）、および20μgml／ゲンタマイシン（Cambrex）で構成される、ヒトin vitroプライミング用T細胞培地（TCM）で一晩インキュベートした。CD8+リンパ球は、製造業者の指示に従い、CD8+MACS陽性分離キット（Miltenyi、Bergisch Gladbach、ドイツ）を用いて単離した。得られたCD8+細胞は、2.5ng/ml IL-7（PromoCell、Heidelberg、ドイツ）および10U/mlIL-2（Chiron、Munich、ドイツ）が補充されたTCM中で使用するまで、インキュベートした。pMHC/抗-CD28 被覆ビーズ、Ｔ細胞刺激および読み出しなどの生成は、僅かな改変をして前述した通り（Walteret al., 2003）に実施した。簡単に言うと、膜貫通型ドメインを欠き重鎖のカルボキ末端でビオチン化された、ビオチン化組み換えHLA-A*0201分子は、（Altmanet al., 1996）が報告した方法に従い生成した。精製した共刺激マウス IgG2a 抗ヒト CD28 Ab 9.3（Jung et al., 1987）は、製造業者が推奨するように、スルホ－Ｎ－ヒドロキシサクシンイミドビオチンで化学的にビオチン化された。使用したビーズは、5.60μmの大きいサイズのストレプタビジン被覆ポリスチレン粒子（BangsLaboratories、米国イリノイ州）である。陽性および陰性コントロールとして使用したpMHCは、それぞれ、A*0201/MLA-001（修飾Melan-A/MART-1から得たペプチドELAGIGILTV）とA*0201/DDX5-001（DDX5から得たYLLPAIVHI）である。

【０３１６】

ビーズ800,000個／200μｌを、600ngのビオチン抗CD28＋200ngの関連ビオチン－pMHC（高密度ビーズ）あるいは、2ngの関連MHC＋200ngの非関連（pMHCライブラリ）MHC（低密度ビーズ）の存在下、96ウェルプレート中で被覆した。5ng/mlIL-12（PromoCell）で補給された 200μl TCM 中で $2x10^5$洗浄済み被覆ビーズと共に$1x10^6$ CD8+ T 細胞を、37°Cで3～4日間共インキュベートして、刺激を開始した。

続いて、培地の半分を80U/ml IL-2が補充された新しいTCMと交換し、インキュベーションは37°Cで3～4日間続けた。この刺激サイクルを合計3回実施した。最後に、四量体分析は、蛍光MHC四量体（Altmanet al., 1996)に報告されている通り作製）＋ 抗体CD8-FITCクローンSK1（BD、Heidelberg、ドイツ）を用い、4色FACSCalibur（BD）にて実施した。ペプチド特異的細胞をCD8+T細胞の合計パーセンテージとして計算した。四量体分析の評価は、ソフトウェアFCS Express（De Novo Software）を用いて行った。特定の四量体＋CD8+リンパ球のin vitroプライミングは、適切なゲート開閉と陰性コントロール刺激との比較によって、検出した。一例の健常ドナーについてin vitroで刺激された評価可能な少なくとも1つのウェルに、in vitro刺激後、特異的なCD8+ T細胞株が含まれることが発見された場合（すなわち、このウェルがCD8+ T細胞中に少なくとも1％の特異的四量体+を含んでおり、特異的四量体＋細胞のパーセンテージが陰性コントロール刺激の中央値の少なくとも10倍であった場合）、特定抗原の免疫原性が検出された。

【０３１７】

IMA950ペプチドのIn vitro免疫原性

検討したHLAクラスIペプチドについて、in vitro免疫原性はペプチド特異的T細胞株を生成させることにより証明できた。本発明の２つのペプチドに対する、TUMAP-特異的四量体染色後の典型的なフロサイトメトリーの結果を図３に示す。

本発明13個のペプチドの結果を表３に要約する。

【０３１８】

表３：本発明の高免疫原性 HLA class I ペプチドのin vitro 免疫原性
【表３】

抗原	陽性ドナー数／試験ドナー数	陽性ウェル数／試験ウェル数
BCA-001	60%	5%
BCA-002	75%	35%
CLIP2-001	75%	6%
CSP-001	100%	57%
FABP7-001	100%	27%
IGF2BP3-001	50%	21%
NES-001	75%	38%
NLGN4X-001	100%	62%
NRCAM-001	86%	39%
PDPN-001	60%	11%
SLCO1C1-001	60%	7%
TNC-001	60%	30%
TNC-002	50%	14%

【０３１９】
健常血液ドナーから得られたこれらの結果に加え、少数の神経膠芽細胞腫患者では、ペプチドBCA-002、CHI3L1-001、およびNLGN4X-001も検討した。全てのペプチドは健常ドナーと比較し、同程度の免疫原性であることが証明され、このワクチンの関連標的集団には前駆T細胞が存在することを示している。
【０３２０】
実施例４：
本発明のHLAクラスI拘束性ペプチドのHLA-A*0201への結合
目的および概要
本分析の目的は、癌免疫療法の一部としてのペプチドの作用機序の重要なパラメータであるため、HLA-A*0201対立遺伝子によってコードされるMHC分子へのHLAクラスIペプチドの親和性を評価することであった。試験したHLA クラスI-拘束性ペプチド0のHLA-A*0201への親和性は、B型肝炎コア抗原由来の既知で強いA*02結合因子である、陽性コントロールペプチド HBV-001の解離定数の範囲で、中等度から強度であった。これらの結果から、本発明で試験したすべての HLA クラスI ペプチドは強い結合親和性を有することが確認された。
【０３２１】
試験の原理
Stable HLA/peptide complexesconsist of three molecules: HLA heavy chain, beta-2 microglobulin (b2m) and thepeptidic ligand 変性組み換えHLA-A*0201重鎖分子単独

の活性は、その重鎖分子に「空のHLA-A*0201分子」と同等な機能を与えながら保存することができる。これらの分子は、b2mと適切なペプチドを含む水性緩衝剤に希釈すると、完全にペプチド依存的に迅速に効率よく折り畳まれる。これらの分子の有用性は、ペプチドとHLAクラスI分子間の相互作用の親和性を測定する、ELISAに基づくアッセイで利用されている（Sylvester-Hvidet al., 2002）。

【０３２２】

精製された組み換えHLA-A*0201分子は、b2mと共にインキュベートされ、関心のあるペプチドの用量を評価した。新規折り畳みHLA／ペプチド複合体の量は、定量的ELISA法で測定した。解離定数（KD値）は、較正物質であるHLA／ペプチド複合体を希釈して記録した標準曲線を用いて計算した。

【０３２３】

結果

結果は、図４に示している。KD値が低いほどHLA-A*0201への親和性は高い。本発明のすべての試験ペプチドは、既知の強いA*02 結合因子である、陽性コントロールペプチドHBV-001の解離定数付近で、HLA-A*0201 と強い親和性を有している従って、全ての本発明のクラスITUMAPはMHC分子A*02に対して中等度から強度の結合親和性を持つ。

【０３２４】

参考文献

1. Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN,Mestas J, Heard C, Hughes CC (2002). Identification of endothelial cell genesexpressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-I,(beta)ig-h3, and NrCAM. Microvasc. Res. 63, 159-171.

2. Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Imran AK (2007).Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductalcarcinoma of the breast. Med J Malaysia 62, 6-8.

3. Altaian JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH,Heyzer- Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM (1996). Phenotypicanalysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 274, 94-96.

4. Angileri FF, Aguennouz M, Conti A, La TD,Cardali S, Crupi R, Tomasello C, Germano A, Vita G, Tomasello F (2008). Nuclearfactor-kappaB activation and differential expression of survivin and Bcl-2 inhuman grade 2-4 astrocytomas. Cancer.

5. Ariyama T, Hasegawa K, Inazawa J, Mizuno K,Ogimoto M, Katagiri T, Yakura H (1995). Assignment of the human proteintyrosine phosphatase, receptor-type, zeta (PTPRZ) gene to chromosome band7q31.3. Cytogenet. Cell Genet. 70, 52-54.

6. Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M,Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM,Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J (2001). Immune and clinical responsesin patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendriticcell vaccine. Cancer Res. 61, 6451-6458.

7. Barnea G, Silvennoinen O, Shaanan B, HoneggerAM, Canoll PD, D'Eustachio P, Morse B, Levy JB, Laforgia S, Huebner K, .(1993). Identification of a carbonic anhydrase-like domain in the extracellularregion of RPTP gamma defines a new subfamily of receptor tyrosine phosphatases.MoI. Cell Biol. 13, 1497-1506.

8. Bartsch S, Bartsch U, Domes U, Faissner A,Weller A, Ekblom P, Schachner M (1992). Expression of tenascin in thedeveloping and adult cerebellar cortex. J Neurosci. 12, 736-749.

9. Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP,Schirmacher P (2000). Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness ofmonocytes. Blood 95, 3964-3969.

10. Bertoletti A, Chisari FV, Penna A,Guilhot S, Galati L, Missale G, Fowler P, Schlicht HJ, Vitiello A, Chesnut RC,. (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within thehepatitis B virus nucleocapsid protein. J. Virol. 67, 2376-2380.

11. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S,Aguzzi A, Birchmeier C (1995). Essentia l role for the c- met receptor in themigration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature 376, 768- 771.
12. Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G,Kloog Y (2006). Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by theRas inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis.MoI. Cancer Ther. 5, 2337-2347.
13. Bolliger MF, Frei K, WinterhalterKH, Gloor SM (2001). Identification of a novel neuroligin in humans which bindsto PSD-95 and has a widespread expression. Biochem. J 356, 581- 588.
14. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL,Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaro nson SA (1991). Identification of thehepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. Science251, 802-804.
15. Bourdon MA, Wikstrand CJ, FurthmayrH, Matthews TJ, Bigner DD (1983). Human glioma- mesenchymal extracellularmatrix antigen defined by monoclonal antibody. Cancer Res. 43, 2796-2805.
16. Bowen AR, Hanks AN, Murphy KJ, FlorellSR, Grossman D (2004). Proliferation , apoptosis, and survivin expression inkeratinocytic neoplasms and hyperplasias. Am J Dermatopathol. 26, 177-181.
17. Brekke C, Lundervold A, Enger PO,Brekken C, Stalsett E, Pedersen TB, Haral dseth O, Kruger PG, Bjerkvig R,Chekenya M (2006). NG2 expression regulates vascu lar morphology and function inhuman brain tumours. Neuroimage. 29, 965-976.
18. Campoli MR, Chang CC, Kageshita T,Wang X, McCarthy JB, Ferrone S (2004). H uman high molecular weight-melanoma-associatedantigen (HMW-MAA): a melanoma cell surface chondroitin sulfate proteoglycan(MSCP) with biological and clinical sig nificance. Crit Rev. Immunol. 24,267-296.
19. Casati C, Dalerba P, Rivoltini L,Gallino G, Deho P, Rini F, Belli F, Mezza nzanica D, Costa A, Andreola S, Leo E,Parmiani G, Castelli C (2003). The apoptos is inhibitor protein survivin inducestumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in col orectal cancer patients. Cancer Res.63, 4507-4515.
20. Chakravarti A, Noll E, Black PM,Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Locffler JS (2002). Quantitativelydetermined survivin expression levels are of p rognostic value in human gliomas.J Clin Oncol 20, 1063-1068.
21. Chanock SJ, Foster CB, Miller FW, OHanlon TP(2004). HLA-A, -B, -Cw, -DQAl and - DRBl Alleles in a CaucasianPopulation from Bethesda, USA. Hum. Immunol. 6 5, 1211- 1223.
22. Chekenya M, Enger PO, Thorsen F,Tysnes BB, Al-Sarraj S, Read TA, Furmanek T, Mahesparan R, Levine JM, Butt AM,Pilkington GJ, Bjerkvig R (2002a). The glial precursor proteoglycan, NG2, isexpressed on tumour neovasculature by vascular p ericytes in human malignantbrain tumours. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 28, 367-380.
23. Chekenya M, Hjelstuen M, Enger PO,Thorsen F, Jacob AL, Probst B, Haraldset h O, Pilkington G, Butt A, Levine JM,Bjerkvig R (2002b). NG2 proteoglycan promot es angiogenesis-dependent tumorgrowth in CNS by sequestering angiostatin. FASEB J 16, 586- 588.
24. Chekenya M, Immervoll H (2007).NG2/HMP proteoglycan as a cancer therapeuti c target. Methods MoI. Biol. 361,93-117.
25. Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A,Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, Sel heim F, Wang J, Sakariassen PO, SandalT, Lonning PE, Flatmark T, Enger PO, Bjerk vig R, Sioud M, Stallcup WB (2008).The progenitor cell marker NG2/MPG promotes c hemoresistance by activation ofintegrin-dependent PI3K/ Akt signaling. Oncogene.

26. Chekenya M, Pilkington GJ (2002).NG2 precursor cells in neoplasia: functio nal, histogenesis and therapeuticimplications for malignant brain tumours. J Neu rocytol. 31, 507-521.
27. Chekenya M, Rooprai HK, Davies D,Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ (1999). The NG2 chondroitin sulfateproteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. Int J Dev.Neurosci. 17, 421-435.
28. Chiquet-Ehrismann R (1993). Tenascin andother adhesion-modulating proteins in cancer. Semin. Cancer Biol. 4, 301-310.
29. Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M(2003). Tenascins: regulation and putative f unctions during pathologicalstress. J Pathol. 200, 488-499.
30. Conacci-Sorrell M, Kaplan A, RavehS, Gavert N, Sakurai T, Ben-Ze'ev A (200 5). The shed ectodomain of Nr-CAMstimulates cell proliferation and motility, and confers cell transformation.Cancer Res. 65, 11605-11612.
31. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T,Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze 'ev A (2002). Nr-CAM is a target geneof the beta-catenin/LEF-1 pathway in melano ma and colon cancer and itsexpression enhances motility and confers tumorigenesi s. Genes Dev. 16, 2058-2072.
32. Corso S, Migliore C, Ghiso E, DeRG, Comoglio PM, Giordano S (2008). Silenc ing the MET oncogene leads toregression of experimental tumors and metastases. O ncogene 27, 684-693.
33. Davis JQ, Bennett V (1994). Ankyrinbinding activity shared by the neurofas cin/Ll /NrCAM family of nervous systemcell adhesion molecules. J Biol. Chem. 269 , 27163-27166.
34. Di Renzo MF, OliveroM, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordl inger B, Brεtti S,Bottardi S, Giordano S, . (1995). Overexpression and amplific ation of themet/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. C lin. CancerRes. 1, 147-154.
35. Di Renzo MF, Olivero M, Martone T,Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, ComoglioPM (2000). Somatic mutations of the MET onc ogene are selected during metastaticspread of human HNSC carcinomas. Oncogene 19 , 1547-1555.
36. Dong G, Chen Z, Li ZY, Yeh NT,Bancroft CC, Van WC (2001). Hepatocyte growt h factor/scatter factor-inducedactivation of MEK and PDK signal pathways contrib utes to expression ofproangiogenic cytokines interleukin-8 and vascular endothel ial growth factor inhead and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 61, 5911-5918.
37. Ebert M, Yokoyama M, Friess H,Buchler MW, Korc M (1994). Coexpression of t he c-met proto-oncogene andhepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. Cancer Res. 54, 5775-5778.
38. Eckerich C, Zapf S, Fillbrandt R,Loges S, Westphal M, Lamszus K (2007). Hy poxia can induce c-Met expression inglioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. Int J Cancer 121,276-283.
39. Erfurt C, Sun Z, Haendle I,Schuler-Thurner B, Heirman C, Thielemans K, van der BP, Schuler G, Schultz ES(2007). Tumor-reactive CD4+ T cell responses to th e melanoma- associatedchondroitin sulphate proteoglycan in melanoma patients and healthy individualsin the absence of autoimmunity. J Immunol. 178, 7703-7709.
40. Feng L, Flatten ME, Heintz N(1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in thedeveloping mammalian CNS. Neuron 12, 895-908.
41. Feng L, Heintz N (1995).Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid- bindingprotein gene in radial glia through a novel regulatory e

lement. Development121, 1719-1730.
42. Ferracini R, Di Renzo MF, ScotlandiK, Baldini N, Olivero M, Lollini P, Cremona O, Campanacci M, Comoglio PM(1995). The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and isactivated by either a paracrine or an autocrine circuit. Oncogene 10, 739-749.
43. Fischer J, Palmedo G, von KR,Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998). Duplication andoverexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiplehereditary papillary renal cell tumours. Oncogene 17, 733-739.
44. Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN,Faure M, Howlett AR, Lipson KE, Woude GF, Webb CP (2001). Suppression ofRas-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Metreceptor tyrosine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 98, 10722-10727.
45. Furge KA, Zhang YW, Vande Woude GF(2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapterproteins. Oncogene 19, 5582-5589.
46. Garcion E, Halilagic A, Faissner A,ffrench-Constant C (2004). Generation of an environmental niche for neural stemcell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. Development131, 3423-3432.
47. Gary SC, Kelly GM, Hockfield S(1998). BEHAB/brevican: a brain-specific lεctican implicated ingliomas and glial cell motility. Curr. Opin. Neurobiol. 8, 576-581.
48. Gary SC, Zerillo CA, Chiang VL, GawJU, Gray G, Hockfield S (2000). cDNA cloning, chromosomal localization, andexpression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycanregulated during cortical development and in glioma. Gene 256, 139- 147.
49. Gebbink MF, van E, I, Hateboer G,Suijkerbuijk R, Beijersbergen RL, Geurts van KA, Moolenaar WH (1991). Cloning,expression and chromosomal localization of a new putative receptor-like proteintyrosine phosphatase. FEBS Lett. 290, 123-130.
50. Ghosh JC, Dohi T, Kang BH, AltieriDC (2008). Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis. J Biol. Chem. 283,5188-5194.
51. Giordano S, Ponzetto C, Di RenzoMF, Cooper CS, Comoglio PM (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishablefrom the c-met protein. Nature 339, 155-156.
52. Glass R, Synowitz M, Kronenberg G,Walzlein JH, Markovic DS, Wang LP, Gast D, Kiwit J, Kempermann G, Kettenmann H(2005). Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells isassociated with improved survival. J Neurosci. 25, 2637-2646.
53. Glatz JF, Luiken JJ, van BM, van d,V (2002). Cellular lipid binding proteins as facilitators and regulators oflipid metabolism. MoI. Cell Biochem. 239, 3-7.
54. Glatz JF, Storch J (2001).Unravelling the significance of cellular fatty acid-binding proteins. Curr.Opin. Lipidol. 12, 261 -21 A.
55. Godbout R, Bisgrove DA, Shkolny D,Day RS, III (1998). Correlation of B-FABP and GFAP expression in malignantglioma. Oncogene 16, 1955-1962.
56. Grumet M, Mauro V, Burgoon MP,Edelman GM, Cunningham BA (1991). Structure of a new nervous systemglycoprotein, Nr-CAM, and its relationship to subgroups of neural cell adhesionmolecules. J Cell Biol. 113, 1399-1412.
57. Grunda JM, Nabors LB, Palmer CA,Chhieng DC, Steg A, Mikkelsen T, Diasio RB, Zhang K, Allison D, Grizzle WE,Wang W, Gillespie GY, Johnson MR (2006). Increased expression of thymidylatesynthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USPlO) and survivin isassociated with poor survival in glioblastoma multiforme (GB

M). J Neurooncol.80, 261-274.
58. Gunther HS, Schmidt NO, PhillipsHS, Kemming D, Kharbanda S, Soriano R, Modrusan Z, Meissner H, Westphal M,Lamszus K (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures formdistinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. Oncogene 27,2897-2909.
59. Harroch S, Furtado GC, Brueck W,Rosenbluth J, Lafaille J, Chao M, Buxbaum JD, Schlessinger J (2002). A criticalrole for the protein tyrosine phosphatase receptor type Z in functionalrecovery from demyelinating lesions. Nat. Genet. 32, 411-414.
60. Hau P, Kunz-Schughart LA, RummeleP, Arslan F, Dorfelt A, Koch H, Lohmeier A, Hirschmann B, Muller A, Bogdahn U,Bosserhoff AK (2006). Tenascin-C protein is induced by transforming growthfactor-betal but does not correlate with time to tumor progression inhigh-grade gliomas. J Neurooncol. 77, 1-7.
61. Heimberger AB, Hussain SF, AldapeK, Sawaya R, Archer GA, Friedman H, Reardon D, Friedman A, Bigner DD, SampsonJH. Tumor-specific peptide vaccination in newly- diagnosed patients with GBM.Journal of Clinical Oncology, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I VoI24, No. 18S (June 20 Supplement), 2006: 2529. 20-6-2006.
62. Herold-Mende C, Mueller MM,Bonsanto MM, Schmitt HP, Kunze S, Steiner HH (2002). Clinical impact andfunctional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. Int. JCancer 98, 362-369.
63. Hoffmann NE, Sheinin Y, Lohse CM,Parker AS, Leibovich BC, Jiang Z, Kwon ED (2008). External validation of IMP3expression as an independent prognostic marker for metastatic progression anddeath for patients with clear cell renal cell carcinoma. Cancer 112, 1471-1479.
64. Hu B, Kong LL, Matthews RT,Viapiano MS (2008). The proteoglycan brevican binds to fibronectin afterproteolytic cleavage and promotes glioma cell motility. J Biol. Chem.
65. Huang PH, Cavenee WK, Furnari FB,White FM (2007a). Uncovering therapeutic targets for glioblastoma: a systemsbiology approach. Cell Cycle 6, 2750-2754.
66. Huang PH, Mukasa A, Bonavia R,Flynn RA, Brewer ZE, Cavenee WK, Furnari FB, White FM (2007b). Quantitativeanalysis of EGFRvIII cellular signaling networks reveals a combinatorialtherapeutic strategy for glioblastoma. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A 104,12867- 12872.
67. Jamain S, Quach H, Betancur C,Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, GillbergC, Bourgeron T (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. Nat. Genet. 34, 27-29.
68. Jaworski DM, Fager N (2000).Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (Timp-3) mRNA expressionduring rat CNS development. J Neurosci. Res. 61, 396-408.
69. Jaworski DM, Kelly GM, Hockfield S(1999). Intracranial injury acutely induces the expression of the secretedisoform of the CNS-specific hyaluronan-binding protein BEHAB/brevican. Exp.Neurol. 157, 327-337.
70. Jaworski DM, Kelly GM, PiepmeierJM, Hockfield S (1996). BEHAB (brain enriched hyaluronan binding) is expressedin surgical samples of glioma and in intracranial grafts of invasive gliomacell lines. Cancer Res. 56, 2293-2298.
71. Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Rock KL,Liu Q, Hsieh CC, Li C, Chen W, Duan HO, McDougal S, Wu CL (2006). Analysis ofRNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma:a retrospective study. Lancet Oncol 7,

556-564.
72. Jiang Z, Lohse CM, Chu PG, Wu CL,Woda BA, Rock KL, Kwon ED (2008). Oncofetal protein IMP3: a novel molecularmarker that predicts metastasis of papillary and chromophobe renal cellcarcinomas. Cancer 112, 2676-2682.
73. Jung G, Ledbetter JA,Muller-Eberhard HJ (1987). Induction of cytotoxicity in resting human Tlymphocytes bound to tumor cells by antibody heteroconjugates. Proc Natl AcadSci U S A 84, 461 1-4615.
74. Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S,Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K (2003). Expression ofsurvivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis.Cancer 97, 1077-1083.
75. Kaloshi G, Mokhtari K, CarpentierC, Taillibert S, Lejeune J, Marie Y, Delattre JY, Godbout R, Sanson M (2007).FABP7 expression in glioblastomas: relation to prognosis, invasion and EGFRstatus. J Neurooncol. 84, 245-248.
76. Kammula US, Kuntz EJ, Francone TD,Zeng Z, Shia J, Landmann RG, Paty PB, Weiser MR (2007). Molecular co-expressionof the c-Met oncogene and hepatocyte growth factor in primary colon cancerpredicts tumor stage and clinical outcome. Cancer Lett. 248, 219-228.
77. Kaplan R, Morse B, Huebner K, CroceC, Howk R, Ravera M, Ricca G, Jaye M, Schlessinger J (1990). Cloning of threehuman tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linkedprotein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A87, 7000-7004.
78. Kendall SE, Najbauer J, JohnstonHF, Metz MZ, Li S, Bowers M, Garcia E, Kim SU, Barish ME, Aboody KS, Glackin CA(2008). Neural Stem Cell Targeting of Glioma is Dependent on PBK Signaling.Stem Cells.
79. Kim CH, Bak KH, Kim YS, Kim JM, KoY, Oh SJ, Kim KM, Hong EK (2000). Expression of tenascin-C in astrocytictumors: its relevance to proliferation and angiogenesis. Surg Neurol. 54,235-240.
80. Knutson KL, Disis ML (2005).Augmenting T helper cell immunity in cancer. Curr. Drug Targets. Immune. Endocr.Metabol. Disord. 5, 365-371.
81. Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S,Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997). Met andhepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. CancerRes. 57, 5391-5398.
82. Kosari F, Parker AS, Kube DM, LohseCM, Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, Vasmatzis G (2005). Clear cell renalcell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature fortumor aggressiveness. Clin Cancer Res. 11, 5128-5139.
83. Krueger NX, Streuli M, Saito H(1990). Structural diversity and evolution of human receptor- like proteintyrosine phosphatases. EMBO J 9, 3241-3252.
84. Kucharczak J, Pannequin J, Camby I,Decaestecker C, Kiss R, Martinez J (2001). Gastrin induces over-expression of genesinvolved in human U373 glioblastoma cell migration. Oncogene 20, 7021-7028.
85. Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F,Bruning G, Spener F, Muller T (1994). The expression pattern of a novel geneencoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glialcell development. Development 120, 2637-2649.
86. LaI A, Peters H, St CB, Haroon ZA,Dewhirst MW, Strausberg RL, Kaanders JH, van der Kogel AJ, Riggins GJ (2001).Transcriptional response to hypoxia in human tumors. J Natl. Cancer Inst. 93,1337-1343.
87. Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F,Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, CalvasP, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C,Moraine C, Briault S (2004). X-linked mental

retardation and autism areassociated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroliginfamily. Am J Hum. Genet. 74, 552-557.
88. Lawson-Yuen A, Saldivar JS, SommerS, Picker J (2008). Familial deletion within NLGN4 associated with autism andTourette syndrome. Eur. J Hum. Genet. 16, 614-618.
89. Levy JB, Canoll PD, Silvennoinen O,Barnea G, Morse B, Honegger AM, Huang JT, Cannizzaro LA, Park SH, Druck T, .(1993). The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressedin the central nervous system. J Biol. Chem. 268, 10573-10581.
90. Li G, Schaider H, Satyamoorthy K,Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M (2001). Downregulation of E-cadherin andDesmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development.Oncogene 20, 8125-8135.
91. Li L, Xu H, Spaulding BO, Cheng L,Simon R, Yao JL, di Sant'agnese PA, Bourne PA, Huang J (2008). Expression ofRNA-binding protein IMP3 (KOC) in benign urothelium and urothelial tumors. Hum.Pathol.
92. Liang Y, Bollen AW, Aldape KD,Gupta N (2006). Nuclear FABP7 immunoreactivity is preferentially expressed ininfiltrative glioma and is associated with poor prognosis in EGFR-overexpressing glioblastoma. BMC. Cancer 6, 97.
93. Liang Y, Diehn M, Watson N, BollenAW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO, IsraelMA (2005). Gene expression profiling reveals molecularly and clinicallydistinct subtypes of glioblastoma multiforme. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A102, 5814-5819.
94. Liao B, Hu Y, Herrick DJ, Brewer G(2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator ofinsulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562leukemia cells. J Biol. Chem. 280, 18517-18524.
95. Liu X, Chen N, Wang X, He Y, ChenX, Huang Y, Yin W, Zhou Q (2006). Apoptosis and proliferation markers indiffusely infiltrating astrocytomas: profiling of 17 molecules. J Neuropathol.Exp. Neurol. 65, 905-913.
96. Livingston BD, Crimi C, Grey H,Ishioka G, Chisari FV, Fikes J, Grey H, Chesnut RW, Sette A (1997). Thehepatitis B virus-specific CTL responses induced in humans by lipopeptidevaccination are comparable to those elicited by acute viral infection. J.Immunol. 159, 1383- 1392.
97. Lo ML, Staibano S, Pannone G,Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, Chieffi P, Tramontano D, De RG, AltieriDC (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressivesquamous cell carcinoma. Exp. MoI. Pathol. 70, 249-254.
98. Long IS, Han K, Li M, Shirasawa S,Sasazuki T, Johnston M, Tsao MS (2003). Met receptor overexpression andoncogenic Ki-ras mutation cooperate to enhance tumorigenicity of colon cancercells in vivo. MoI. Cancer Res. 1, 393-401.
99. Lu KV, Jong KA, Kim GY, Singh J,Dia EQ, Yoshirnoto K, Wang MY, Cloughεsy TF, Nelson SF, Mischel PS(2005). Differential induction of glioblastoma migration and growth by twoforms of pleiotrophin. J Biol Chem. 280, 26953-26964.
100. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D (1988).Induction of tenascin in healing wounds. J Cell Biol. 107, 2757-2767.
101. Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M,Gorunova L, Hoglund M, Karhu R, Kallioniemi A (2002). Frequent amplification of8q24, Hq, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. Genes Chromosomes.Cancer 35, 353-358.
102. Maulik G, Kijima T, Ma PC, Ghosh SK, LinJ, Shapiro GI, Schaefer E, Tibaldi E, Johnson BE, Salgia R (2002). Modulationof the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer. Clin.Cancer Res. 8, 620-627.
103. Mellai M, Caldera V, Patrucco A,Annovazzi L, Schiffer D (2008). Survivin e

xpression in glioblastomas correlateswith proliferation, but not with apoptosis. Anticancer Res. 28, 109- 118.
104. Miller SJ, Li H, Rizvi TA, Huang Y,Johansson G, Bowersock J, Sidani A, Vitullo J, Vogel K, Parysek LM, DeClue JE,Ratner N (2003). Brain lipid binding protein in axon-Schwann cell interactionsand peripheral nerve tumorigenesis. MoI. Cell Biol. 23, 2213-2224.
105. Mita R, Coles JE, Glubrecht DD, Sung R,Sun X, Godbout R (2007). B-FABP-expressing radial glial cells: the malignantglioma cell of origin? Neoplasia. 9, 734-744.
106. Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, Takano A,Tsunoda T, Kawaguchi Y, Nakamura Y, Fujii H (2008). Detection of novelcancer-testis antigen-specific T-cell responses in TIL, regional lymph nodes,and PBL in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci.
107. Mizuno K, Higuchi O, IhIe JN, Nakamura T(1993). Hepatocyte growth factor stimulates growth of hematopoietic progenitorcells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194, 178-186.
108. Molenkamp BG, Vuylsteke RJ, van LeeuwenPA, Meijer S, Vos W, Wijnands PG, Scheper RJ, de Gruijl TD (2005). Matched skinand sentinel lymph node samples of melanoma patients reveal exclusive migrationof mature dendritic cells. Am. J Pathol. 167, 1301-1307.
109. Mondino A, Giordano S, Comoglio PM(1991). Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinaseencoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). MoI.Cell Biol. 11, 6084-6092.
110. Montesano R, Soriano JV, Malinda KM,Ponce ML, Bafico A, Kleinman HK, Bottaro DP, Aaronson SA (1998). Differentialeffects of hepatocyte growth factor isoforms on epithelial and endothelialtubulogenesis. Cell Growth Differ. 9, 355-365.
111. Morales G, Hubert M, Brummendorf T,Treubert U, Tarnok A, Schwarz U, Rathjen FG (1993). Induction of axonal growthby heterophilic interactions between the cell surface recognition proteins Fl 1and Nr-CAM/Bravo. Neuron 11, 1113-1122.
112. Mori M, Beatty PG, Graves M, Boucher KM,Milford EL (1997). HLA gene and haplotype frequencies in the North Americanpopulation: the National Marrow Donor Program Donor Registry. Transplantation64, 1017-1027.
113. Moriyama T, Kataoka H, Koono M, WakisakaS (1999). Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and itsreceptor c-Met in brain tumors: evidence for a role in progression ofastrocytic tumors (Review). Int J MoI. Med 3, 531-536.
114. Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C,Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H, Varga G, Friess H, Buchler M, Beger HG,Vila MR, Adler G, Gress TM (1997). Cloning of a gene
115. highly overexpressed in cancer coding fora novel KH-domain containing protein. Oncogene 14, 2729-2733.
116. Mulholland PJ, Fiegler H, Mazzanti C,Gorman P, Sasieni P, Adams J, Jones TA, Babbage JW, Vatcheva R, Ichimura K,East P, Poullikas C, Collins VP, Carter NP, Tomlinson IP, Sheer D (2006).Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocationsin glioblastoma multiforme. Cell Cycle 5, 783-791.
117. Nakaigawa N, Yao M, Baba M, Kato S,Kishida T, Hattori K, Nagashima Y, Kubota Y (2006). Inactivation of vonHippel-Lindau gene induces constitutive phosphorylation of MET protein in clearcell renal carcinoma. Cancer Res. 66, 3699-3705.
118. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, GaudinoG, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM (1991). Hepatocyte growth factor(HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by theproto-oncogene c-MET. Oncogene 6, 501-50

4.
119. Nam DH, Kong DS, Kyeung MJ, Kim S. c-MET:A Potential Candidate of Glioblastoma Cancer Stem Cell Targeted Marker. TheRole of Cancer Stem Cells in the Initiation and Propagation of Tumorigenesis -An AACR Special Conference in Cancer Research, Los Angeles. ConferenceProceedings, A45. 12-2-2008. 12-2-0080.
120. Ref Type: Conference Proceeding
121. Neumann F, Wagner C, Kubuschok B,Stevanovic S, Rammensee HG, Pfreundschuh M (2004). Identification of anantigenic peptide derived from the cancer-testis antigen NY-ESO- 1 binding to abroad range of HLA-DR subtypes. Cancer Immunol. Immunother. 53, 589-599.
122. Nutt CL, Matthews RT, Hockfield S (2001).Glial tumor invasion: a role for the upregulation and cleavage ofBEHAB/brevican. Neuroscientist. 7, 113-122.
123. O'Driscoll L, Linehan R, Clynes M (2003).Survivin: role in normal cells and in pathological conditions. Curr. CancerDrug Targets. 3, 131-152.
124. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, Osaki T, KyoT, Nakajima H, Elisseeva OA, Oji Y, Kawakami M, Ikegame K, Hosen N, YoshiharaS, Wu F, Fujiki F, Murakami M, Masuda T, Nishida S, Shirakata T, Nakatsuka S,Sasaki A, Udaka K, Dohy H, Aozasa K, Noguchi S, Kawase I, Sugiyama H (2004).Induction of WTl (Wilms[1] tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes byWTl peptide vaccine and the resultant cancer regression. Proc Natl. Acad. Sci.U. S. A 101, 13885-13890.
125. Olivero M, Valente G, Bardelli A, LongatiP, Ferrero N, Cracco C, Terrone C, Rocca-Rossetti S, Comoglio PM, Di Renzo MF(1999). Novel mutation in the ATP-binding site of the MET oncogene tyrosinekinase in a HPRCC family. Int. J Cancer 82, 640-643.
126. Pai R, Nakamura T, Moon WS, Tarnawski AS(2003). Prostaglandins promote colon cancer cell invasion; signaling bycross-talk between two distinct growth factor receptors. FASEB J 17, 1640-1647.
127. Park M, Dean M, Cooper CS, Schmidt M,O'Brien SJ, Blair DG, Vande Woude GF (1986). Mechanism of met oncogeneactivation. Cell 45, 895-904.
128. Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS,Pi JH, Kim BJ, Bae JH, Hong YK, Lee KS, Lee SH, Yoo NJ, Jang JJ, Pack S, ZhuangZ, Schmidt L, Zbar B, Lee JY (1999). Somatic
129. mutations in the kinase domain of theMet/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellularcarcinomas. Cancer Res. 59, 307-310.
130. Perez-Pinera P, Garcia-Suarez O,Menendez-Rodriguez P, Mortimer J, Chang Y, Astudillo A, Deuel TF (2007). Thereceptor protein tyrosine phosphatase (RPTP)beta/zeta is expressed in differentsubtypes of human breast cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362, 5-10.
131. Perrin FE, Rathjen FG, Stoeckli ET(2001). Distinct subpopulations of sensory afferents require FI l or axonin-1for growth to their target layers within the spinal cord of the chick. Neuron30, 707-723.
132. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, ForrestWF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Soroceanu L, Williams PM,Modrusan Z, Feuerstein BG, Aldape K (2006). Molecular subclasses of high-gradeglioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, andresemble stages in neurogenesis. Cancer Cell 9, 157-173.
133. Piesche M, Hildebrandt Y, Zettl F, ChapuyB, Schmitz M, WuIf G, Trumper L, Schroers R (2007). Identification of apromiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor ofapoptosis protein survivin. Hum. Immunol. 68, 572-576.

134. Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, LongatiP, Panayotou G, Dhand R, Waterfiel d MD, Comoglio PM (1993). A novel recognitionmotif for phosphatidylinositol 3-ki nase binding mediates its association withthe hepatocyte growth factor/scatter f actor receptor. MoI. Cell Biol. 13,4600-4608.
135. Prakash S, Sarran L, Socci N, DeMatteoRP, Eisenstat J, Greco AM, Maki RG, Wexler LH, LaQuaglia MP, Besmer P,Antonescu CR (2005). Gastrointestinal stromal tumors in children and youngadults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases andreview of the literature. J Pediatr. Hematol. Oncol 27, 179 -187.
136. Previsani, N. and Lavanchy, D.: HepatitisB (internal immatics research rep ort)
137. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, SpauldingBO, Scott GA, Xu H (2008). IMP-3 is a novel progression marker in malignantmelanoma. Mod. Pathol. 21, 431-437.
138. Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC,Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Ho ng MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT(2002). Met protein expression level corr elates with survival in patients withlate-stage nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 62, 589-596.
139. Rahimi N, Tremblay E, McAdam L, Park M,Schwall R, Elliott B (1996). Identi fication of a hepatocyte growth factorautocrine loop in a murine mammary carcino ma. Cell Growth Differ. 7, 263-270.
140. Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C,Dinauer C, Turtle RM, Francis GL (2000). Over- expression of hepatocyte growthfactor/scatter factor (HGF/SF) and the H GF/SF receptor (cMET) are associatedwith a high risk of metastasis and recurrenc e for children and young adultswith papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol . (Oxf) 53, 635-644.
141. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP,Bachor OA, Stevanovic S (1999). SYFP EITHI: database for MHC ligands and peptidemotifs. Immunogenetics 50, 213-219.
142. Rammensee,H.G., Bachmann,J., and Stevanovic,S.(1997). MHC Ligands and Pept ide Motifs. Springer- Verlag, Heidelberg, Germany).
143. Rammensee HG, FaIk K, Rotzschke O (1993).Peptides naturally presented by M HC class I molecules. Annu. Rev. Immunol. 11,213-244.
144. Rasola A, Fassetta M, De BF, D'AlessandroL, Gramaglia D, Di Renzo MF, Como glio PM (2007). A positive feedback loopbetween hepatocyte growth factor recepto r and beta-catenin sustains colorectalcancer cell invasive growth. Oncogene 26, 1078-1087.
145. Reardon DA, Cloughesy TF, Raizer JJ,Laterra J, Schiff D, Yang X, Loh E, We n PY. Phase II study of AMG 102, a fullyhuman neutralizing antibody against hepa tocyte growth factor/scatterfactor, in patients with recurrent glioblastoma mult iforme. ASCO MeetingAbstracts 26 (May 20 suρpl)[2051]. 20-5-2008.
146. Rehermann B, Nascimbeni M (2005).Immunology of hepatitis B virus and hepat itis C virus infection. Nat. Rev.Immunol. 5, 215-229.
147. Reznik TE, Sang Y, Ma Y, Abounader R,Rosen EM, Xia S, Laterra J (2008). Tr anscription- dependent epidermal growthfactor receptor activation by hepatocyte growth factor. MoI. Cancer Res. 6,139-150.
148. Rubin JS, Bottaro DP, Aaronson SA (1993).Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, the c-metproto-oncogene product. Biochim. Biophys. Acta 1155, 357-371.
149. Ruiz C, Huang W, Hegi ME, Lange K, HamouMF, Fluri E, Oakeley EJ, Chiquet-E hrismann R, Orend G (2004). Growth promotingsignaling by tenascin-C [corrected]. Cancer Res. 64, 7377-7385.

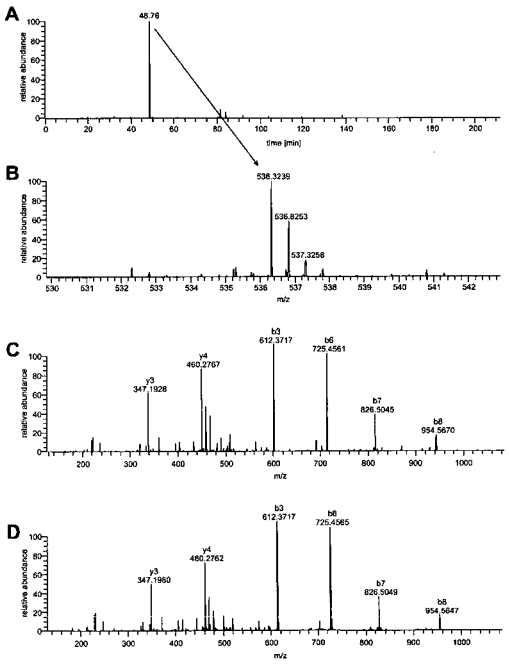
150. Saito T, Arifin MT, Hama S, Kajiwara Y,Sugiyama K, Yamasaki F, Hidaka T, Arita K, Kurisu K (2007). Survivinsubcellular localization in high-grade astrocytomas: simultaneous expression inboth nucleus and cytoplasm is negative prognostic marker. J Neurooncol. 82,193-198.
151. Sakurai T, Lustig M, Babiarz J, FurleyAJ, Tait S, Brophy PJ, Brown SA, Brown LY, Mason CA, Grumet M (2001).Overlapping functions of the cell adhesion molecules Nr-CAM and Ll incerebellar granule cell development. J Cell Biol. 154, 1259-1273.
152. Sakurai T, Lustig M, Nativ M, HemperlyJJ, Schlessinger J, Peles E, Grumet M (1997). Induction of neurite outgrowththrough contactin and Nr-CAM by extracellular regions of glial receptortyrosine phosphatase beta. J Cell Biol. 136, 907-918.
153. Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA(2002). Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors ofthe nervous system. Acta Neuropathol. 104, 105-109.
154. Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T,Mori Y, Hamilton JP, Jin Z, Cheng Y, Paun B, Berki AT, Wang S, Shimada Y,Meltzer SJ (2006). Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specificpromoters. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342, 465-471.
155. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, BrinkmannV, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C (1995). Scatter factor/hepatocytegrowth factor is essential for liver development. Nature 373, 699-702.
156. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T,Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R,Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M,Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML,
157. Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H,Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Storkel S, Lerman MI, Linehan WM, ZbarB (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of theMET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. Nat. Genet. 16, 68-73.
158. Schmidt L, Junker K, Weirich G, Glenn G,Choyke P, Lubensky I, Zhuang Z, Jeffers M, Vande WG, Neumann H, Walther M,Linehan WM, Zbar B (1998). Two North American families with hereditarypapillary renal carcinoma and identical novel mutations in the METproto-oncogene. Cancer Res. 58, 1719-1722.
159. Sehgal A, Boynton AL, Young RF, VermeulenSS, Yonemura KS, Kohler EP, Aldape HC, Simrell CR, Murphy GP (1998). Celladhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors. Int J Cancer76, 451-458.
160. Sehgal A, Ricks S, Warrick J, Boynton AL,Murphy GP (1999). Antisense human neuroglia related cell adhesion moleculehNr-CAM, reduces the tumorigenic properties of human glioblastoma cells.Anticancer Res. 19, 4947-4953.
161. Seyfried TN (2001). Perspectives on braintumor formation involving macrophages, glia, and neural stem cells. Perspect.Biol. Med 44, 263-282.
162. Shimizu F, Watanabe TK, Shinomiya H,Nakamura Y, Fujiwara T (1997). Isolation and expression of a cDNA for humanbrain fatty acid-binding protein (B-FABP). Biochim. Biophys. Acta 1354, 24-28.
163. Sitnikova L, Mendese G, Liu Q, Woda BA,Lu D, Dresser K, Mohanty S, Rock KL, Jiang Z (2008). IMP3 predicts aggressivesuperficial urothelial carcinoma of the bladder. Clin Cancer Res. 14,1701-1706.
164. Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET,Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB (2004). Survivin is anindependent prognostic marker for risk stratificatio

n of breast cancerpatients. Clin Chem. 50, 1986-1993.
165. Stoeckli ET, Landmesser LT (1995).Axonin-1, Nr-CAM, and Ng-CAM play differ ent roles in the in vivo guidance ofchick commissural neurons. Neuron 14, 1165-1 179.
166. Sun Y, Song M, Stevanovic S, Jankowiak C,Paschen A, Rammensee HG, Schadend orf D (2000). Identification of a newHLA-A(*)0201 -restricted T-cell epitope fro m the tyrosinase- related protein 2(TRP2) melanoma antigen. Int. J. Cancer 87, 3 99-404.
167. Takeuchi H, Bilchik A, Saha S, Turner R,Wiese D, Tanaka M, Kuo C, Wang HJ, Hoon DS (2003). c-MET expression level inprimary colon cancer: a predictor of t umor invasion and lymph node metastases.Clin Cancer Res. 9, 1480-1488.
168. Tan HY, Liu J, Wu SM, Luo HS (2005).Expression of a novel apoptosis inhibi tor-survivin in colorectal carcinoma.World J Gastroenterol. 11, 4689-4692.
169. Trusolino L, Comoglio PM (2002).Scatter-factor and semaphorin receptors: c ell signalling for invasive growth.Nat. Rev. Cancer 2, 289-300.
170. Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z,Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yos himoto K, Mischel PS, Liau LM,Cloughesy TF, Nelson SF (2006). Distinct transcrip tion profiles of primary andsecondary glioblastoma subgroups. Cancer Res. 66, 15 9-167.
171. Tuck AB, Park M, Stems EE, Boag A,Elliott BE (1996). Coexpression of hepat ocyte growth factor and receptor (Met)in human breast carcinoma. Am. J. Pathol. 148, 225-232.
172. Uematsu M, Ohsawa I, Aokage T, NishimakiK, Matsumoto K, Takahashi H, Asoh S, Teramoto A, Ohta S (2005). Prognosticsignificance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: acomparative study with the MIB-I index. J Neurooncol. 72, 231-238. van derVoort R, Taher TE, Keehnen RM, Smit L, Groenink M, Pals ST (1997). Paracrineregulation of germinal center B cell adhesion through the c-met-hepatocytegrowth factor/scatter factor pathway. J Exp. Med 185, 2121-2131.
173. Veerkamp JH, Zimmerman AW (2001). Fattyacid-binding proteins of nervous ti ssue. J MoI. Neurosci. 16, 133-142.
174. Viapiano MS, Bi WL, Piepmeier J,Hockfield S, Matthews RT (2005). Novel tum or-specific isoforms ofBEHAB/brevican identified in human malignant gliomas. Can cer Res. 65, 6726-6733.
175. Viapiano MS, Hockfield S, Matthews RT(2008). BEHAB/brevican requires ADAMT S- mediated proteolytic cleavage topromote glioma invasion. J Neurooncol.
176. Viapiano MS, Matthews RT (2006). Frombarriers to bridges: chondroitin sulf ate proteoglycans in neuropathology.Trends MoI. Med 12, 488-496.
177. Volkmer H, Leuschner R, Zacharias U,Rathjen FG (1996). Neurofascin induces neurites by heterophilic interactionswith axonal NrCAM while NrCAM requires FI l on the axonal surface to extendneurites. J Cell Biol. 135, 1059-1069.
178. Walter S, Herrgen L, Schoor O, Jung G,Wernet D, Buhring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S (2003). Cutting edge:predetermined avidity of human CD8 T cells exp anded on calibratedMHC/anti-CD28-coated microspheres. J. Immunol. 171, 4974-4978 .
179. Wang V, Davis DA, Haque M, Huang LE,Yarchoan R (2005). Differential gene u p- regulation by hypoxia-inducible factor- 1 alpha and hypoxia-inducible factor-2 alpha in HEK293T cells. CancerRes. 65, 3299-3306.
180. Wiranowska M, Ladd S, Smith SR,Gottschall PE (2006). CD44 adhesion molecul e and neuro-glial proteoglycan NG2as invasive markers of glioma. Brain Cell Biol . 35, 159-172.

181. Wu CW, Kao HL, Li AF, Chi CW, Lin WC(2006). Protein tyrosine-phosphatase expression profiling in gastric cancertissues. Cancer Lett. 242, 95-103.
182. Xie D, Zeng YX, Wang HJ, Wen JM, Tao Y,Sham JS, Guan XY (2006). Expression of cytoplasmic and nuclear Survivin inprimary and secondary human glioblastoma. Br. J Cancer 94, 108-114.
183. Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, HagaY, Murayama T, Ikei S, Kamei M, Takeno S, Kawahara K (2007). Survivinexpression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. AnticancerRes. 27, 2803-2808.
184. Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C,Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB (2004). Melanoma chondroitinsulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. JCell Biol. 165, 881-891.
185. Yantiss RX, Cosar E, Fischer AH (2008).Use of IMP3 in identification of carcinoma in fine needle aspiration biopsiesof pancreas. Acta Cytol. 52, 133-138.
186. Yantiss RK, Woda BA_5 Fanger GR,Kalos M, Whalen GF, Tada H, Andersen DK, Rock KL, Dresser K (2005).KOC (K homology domain containing protein overexpressed in cancer): a novelmolecular marker that distinguishes between benign and malignant lesions of thepancreas. Am J Surg Pathol. 29, 188-195.
187. Zacharias U, Norenberg U, Rathjen FG(1999). Functional interactions of the immunoglobulin superfamily member FI lare differentially regulated by the extracellular matrix proteins tenascin-Rand tenascin-C. J Biol. Chem. 274, 24357-24365.
188. Zarnegar R, Michalopoulos GK (1995). Themany faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. J.Cell Biol. 129, 1177-1180.
189. Zeng Z, Weiser MR, D'Alessio M, Grace A,Shia J, Paty PB (2004). Immunoblot analysis of c-Met expression in humancolorectal cancer: overexpression is associated with advanced stage cancer.Clin Exp. Metastasis 21, 409-417.
190. Zhang H, Kelly G, Zerillo C, Jaworski DM,Hockfield S (1998). Expression of a cleaved brain-specific extracellular matrixprotein mediates glioma cell invasion In vivo. J Neurosci. 18, 2370-2376.
191. Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z,Zhang JN, Fu LA, He XS, Ma FC, Wang XL (2005). Survivin expression and itsrelation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas.Cancer 104, 2775-2783.
192. Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, MartelM, Schwartz PE, Jiang Z (2008). The oncofetal protein IMP3: a novel biomarkerfor endometrial serous carcinoma. Am J Surg Pathol. 32, 304-315.
193. Ziu M, Schmidt NO, Cargioli TG, AboodyKS, Black PM, Carroll RS (2006). Glioma- produced extracellular matrixinfluences brain tumor tropism of human neural stem cells. J Neurooncol. 79,125-133.

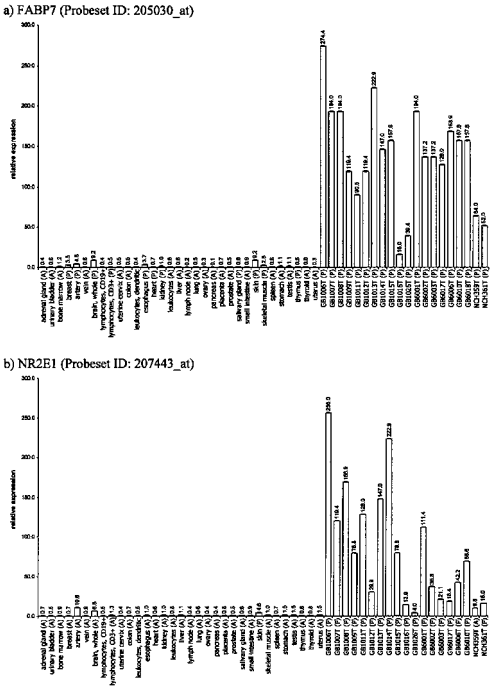
【図１】

Figure 1



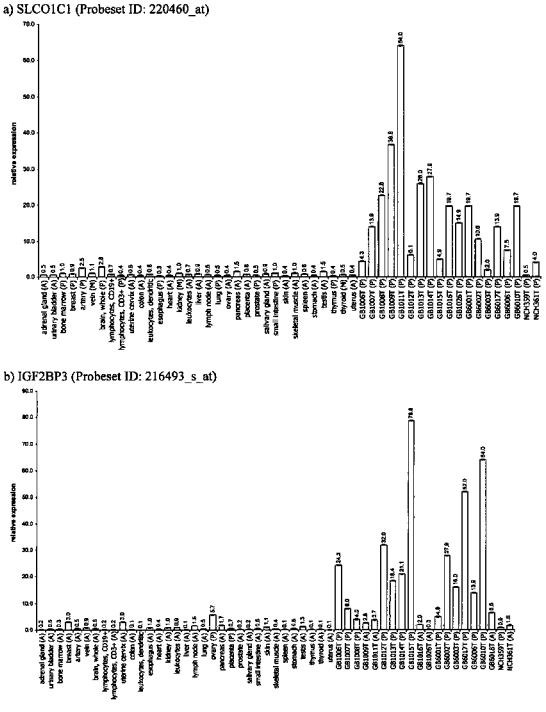
【図２ａ】

Figure 2a



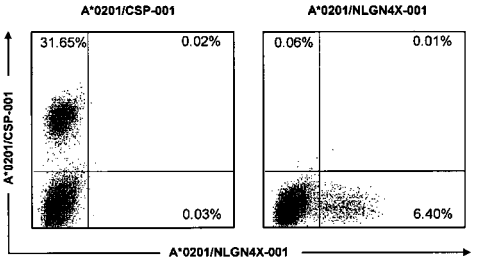
【図２ｂ】

Figure 2b



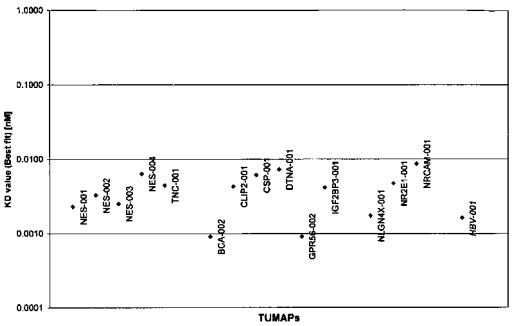
【図３】

Figure 3



【図４】

Figure 4



【配列表】
2012504393000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/00 A61P35/00 A61K38/08 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/045998 A2 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]; PASTEUR INSTITUT [FR]; ASSIST PUBL HOPIT) 5 June 2003 (2003-06-05) figures 10,16; sequences 3,9 page 7, line 33 - page 8, line 2 page 8, line 14 - line 30 page 9, lines 19-24 page 10, lines 18-25 page 11, line 20 - page 12, line 13 page 14, line 34 - page 15, line 23 claims 11-13,27-29,52,53,69-71 -/--	1-12,18

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March 2010	30/03/2010

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Noë, Veerle

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006980

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/116051 A (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]; WEINSCHENK TONI [DE]; LEMMEL CLAUD) 8 December 2005 (2005-12-08) abstract; claims 1-17; sequences 2,14,15,20,49,303 page 3, paragraph 2 - page 4, paragraph 8 table 1 examples 1-3	13-15
A	GARY S C ET AL: "cDNA cloning, chromosomal localization, and expression analysis of human BEHAB/brevican, a brain specific proteoglycan regulated during cortical development and in glioma" GENE, vol. 256, no. 1-2, 3 October 2000 (2000-10-03), pages 139-147, XP004238399 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL ISSN: 0378-1119 cited in the application abstract page 143, column 2, last paragraph - page 145, column 1, paragraph 1	1-19
X	WO 02/46767 A2 (OXFORD GLYCOSCIENCES UK LTD [GB]; HERATH HERATH MUDIYANSELAGE AT [GB];) 13 June 2002 (2002-06-13) page 5, paragraph 16-20 page 61; claims 24,28,29,	1-5, 8-12, 18-19
X	WO 2007/150077 A2 (IMMUNOTOPE INC [US]; RAMAKRISHNA VENKY [US]; ROSS MARK M [US]; PHILIP) 27 December 2007 (2007-12-27) page 1, paragraph 1 page 5, last paragraph - page 6, paragraph 5 page 7, paragraph 4 page 11, last paragraph - page 12, paragraph 3 page 15, last paragraph - page 16, paragraph 1 page 17, paragraph 5 page 18, paragraphs 1,3 page 19, paragraph 3 page 20, paragraph 2 - page 21, paragraph 1 page 23, last paragraph - page 24, paragraph 3 table 2; sequence 158 claims 1,9,12-14,19-23,25,26	1-19

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006980

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/20036 A1 (MUELLER FRIEDERIKE [DE]; GRESS THOMAS [DE]; ADLER GUIDO [DE]) 14 March 2002 (2002-03-14) pages 46-48; sequence 22	1-5,14
A	ANIL SEHGAL ET AL: "Cell adhesion molecule Nr-CAM is over-expressed in human brain tumors" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER, vol. 76, no. 4, 18 May 1998 (1998-05-18), pages 451-458, XP002572958 ISSN: 0020-7136 cited in the application abstract	1-19
X	WO 2004/015390 A2 (APPLERA CORP [US]; HOFFMAN STEPHEN [US]; WANG RUOBING [US]; SUBRAMANIA) 19 February 2004 (2004-02-19) page 4, paragraph 4-7	1-12, 16-18
Y	page 5, paragraphs 3,4,6,8 page 7, paragraph 4-6 page 10, paragraph 4 - page 11, paragraph 4 page 12, paragraph 2-4 page 14, paragraph 3-4 page 15, paragraph 3 page 16, paragraph 2	13-15
E	EP 2 111 867 A1 (IMMATICS BIOTECHNOLOGIES GMBH [DE]) 28 October 2009 (2009-10-28) the whole document	1-20
A	GÜNTHER H S ET AL: "Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria." ONCOGENE, vol. 27, no. 20, 1 May 2008 (2008-05-01), pages 2897-2909, XP002557755 ISSN: 1476-5594 cited in the application page 2899, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	1-20

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/006980

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUZUKI TSUYOSHI ET AL: "Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system." BRAIN TUMOR PATHOLOGY, vol. 21, no. 1, 2004, pages 27-34, XP002557756 ISSN: 1433-7398 cited in the application abstract page 29, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	1-20
A	SHIBAHARA JUNJI ET AL: "Podoplanin is expressed in subsets of tumors of the central nervous system." VIRCHOWS ARCHIV : AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 448, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 493-499, XP002557757 ISSN: 0945-6317 cited in the application abstract	1-20
A	PRAKASH SONAM ET AL: "Gastrointestinal stromal tumors in children and young adults: a clinicopathologic, molecular, and genomic study of 15 cases and review of the literature." JOURNAL OF PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY APR 2005, vol. 27, no. 4, April 2005 (2005-04), pages 179-187, XP008107312 ISSN: 1077-4114 cited in the application abstract page 183, left-hand column, paragraph 1; table 4	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2009/006980

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-20(partially)

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-20(partially)

Invention 1 : claims 1-20 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:1; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

2. claims: 1-19(partially)

Invention 2 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:2; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

3. claims: 1-19(partially)

Invention 3 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:3; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

4. claims: 1-19(partially)

Invention 4 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:4 or SEQ ID NO:5 ; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

5. claims: 1-19(partially)

International Application No. PCT/EP2009/006980

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Inventions 5-14 :as for invention 2 for a peptide comprising SEQ ID No:6 - SEQ ID No:15 ; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

6. claims: 1-19(partially)

Invention 15 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:16,17,18 or 19; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

7. claims: 1-20(partially)

Invention 16 : claims 1-20 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:20; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

8. claims: 1-19(partially)

Invention 17-18 :
as for invention 2 : Peptide comprising SEQ ID No:21 or 22; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer

---

9. claims: 1-19(partially)

Invention 19 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:23; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

10. claims: 1-19(partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 20 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:24; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

11. claims: 1-19(partially)

Invention 21 : claims 1-19 (partially)
Peptide comprising SEQ ID No:25; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

12. claims: 1-19(partially)

Invention 22 : Peptide comprising SEQ ID No:26,27,28,29 or 30; nucleic acid encoding this peptide; expression vector capable of expressing this nucleic; activated cytotoxic lymphocytes that selectively recognise a cell which aberrantly expresses a polypeptide comprising the peptide and their use as a medicament for treating cancer.

---

13. claims: 21-22(partially)

Invention 23 :
Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of BCA and kit for measuring the expression of this marker.

---

14. claims: 21-22(partially)

Invention 24 :
Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of CLIP2 and kit for measuring the expression of this marker.

---

15. claims: 21-22(partially)

Invention 25 :
Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of DTNA and kit for measuring the expression of this marker.

---

16. claims: 21-22(partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 26 :
Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of NLGNAX and kit for measuring the expression of this marker.

---

17. claims: 21-22(partially)

Invention 27 : claims 21-22 (partially) Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of NR2E1 and kit for measuring the expression of this marker.

---

18. claims: 21-22(partially)

Invention 28 : claims 21-22 (partially) Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of NRCAM and kit for measuring the expression of this marker.

---

19. claims: 21-22(partially)

Invention 29 : claims 21-22 (partially) Methods for distinguishing glioblastoma from other forms of cancer comprising analyzing the expression of PDPN and kit for measuring the expression of this marker.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/006980

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03045998 A2	05-06-2003	AU 2002364808 A1	10-06-2003
		CA 2364106 A1	30-05-2003
		EP 1453861 A2	08-09-2004
		US 2005118588 A1	02-06-2005
		US 2009202992 A1	13-08-2009
		US 2009117554 A1	07-05-2009
WO 2005116051 A	08-12-2005	AT 446310 T	15-11-2009
		AU 2005247598 A1	08-12-2005
		CA 2568254 A1	08-12-2005
		DE 102004026135 A1	05-01-2006
		DK 1761553 T3	01-02-2010
		EP 1761553 A2	14-03-2007
		EP 2058323 A1	13-05-2009
		ES 2333804 T3	01-03-2010
		JP 2008500033 T	10-01-2008
		SI 1761553 T1	29-01-2010
		US 2010021441 A1	28-01-2010
		US 2010029573 A1	04-02-2010
WO 0246767 A2	13-06-2002	AU 2210802 A	18-06-2002
		AU 2215602 A	18-06-2002
		EP 1339742 A2	03-09-2003
		EP 1379879 A2	14-01-2004
		WO 0246221 A2	13-06-2002
WO 2007150077 A2	27-12-2007	AU 2007260824 A1	27-12-2007
		CA 2659124 A1	27-12-2007
		EP 2043679 A2	08-04-2009
WO 0220036 A1	14-03-2002	AU 7958101 A	22-03-2002
		EP 1317275 A1	11-06-2003
WO 2004015390 A2	19-02-2004	AU 2003258134 A1	25-02-2004
EP 2111867 A1	28-10-2009	AU 2009201589 A1	12-11-2009
		BR PI0900798 A2	19-01-2010
		CA 2665510 A1	24-10-2009
		EP 2113253 A1	04-11-2009
		JP 2009292810 A	17-12-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		4C087
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		4H045
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	
C07K	*14/47*	*(2006.01)*	C07K	14/47		
C12Q	*1/68*	*(2006.01)*	C12Q	1/68	A	
G01N	*33/574*	*(2006.01)*	G01N	33/574	A	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	M	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ショール，オリヴァー
ドイツ，７２０７０ テュービンゲン，シャルロッテンストラツセ ２１
(72)発明者 ヒルフ，ノルベルト
ドイツ，７２１３８ キルヒュンテリンスフルト，イム ヴェンガートアッカー １７
(72)発明者 ヴァインシェンク，トーニ
ドイツ，７３７７３ アイヒヴァルト，イム モルゲンライン １５
(72)発明者 トラウトヴァイン，クラウディア
ドイツ，４２４８９ ヴュルフラート，ネルケンヴェーク ２
(72)発明者 ヴァルター，シュテッフェン
ドイツ，７２７６４ ロイトリンゲン，シュタイネンベルクストラッセ ２
(72)発明者 ジング，ハルプレート
ドイツ，７２０７２ テュービンゲン，バイ デン プファデシュテレン ９

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA04 CA12 EA04
4B063 QA19 QQ53 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02
4B064 AG01 DA14
4B065 AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA45 CA46
4C085 AA03 BB01 CC32 DD88 EE01
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 CA04 MA66 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA15 CA40 CA41 EA28 EA51 FA74